UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1946-1947 — N° 54

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DOSAGE DE LA PENICILLINE EN CLINIQUE

Applications de la Méthode B. Sureau

(Travail du Laboratoire de Médecine expérimentale)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Mercredi 23 Avril 1947

PAR

Yves CHABBERT

Né le 1er Avril 1921, à Caudéran (Gironde)

Examinateurs de la Thèse

MM. DUPERIÉ, professeur, *Président*
AUBERTIN, professeur
JOULIA, professeur, *Juges*
SARIC, agrégé

BORDEAUX
IMPRIMERIE J. PECHADE
20, rue Margaux, 20

1947

CHABBERT (Yves)

Contribution à l'étude du dosage de la pénicilline en clinique. Applications de la méthode B. Sureau. (Travail du Laboratoire de médecine expérimentale.) — Bordeaux, impr. J. Pechade, 1947. In-8°, 130 p., fig.

(*Thèse Médec. Bordeaux. 1946-1947. N° 54.*)

.....

CHABBERT (Yves)

Contribution à l'étude du dosage de la pénicilline en clinique. Applications de la méthode B. Sureau. (Travail du Laboratoire de médecine expérimentale.) — Bordeaux, impr. J. Pechade, 1947. In-8°, 130 p., fig.

(*Thèse Médec. Bordeaux. 1946-1947. N° 54.*)

.....

CHABBERT (Yves)

Contribution à l'étude du dosage de la pénicilline en clinique. Applications de la méthode B. Sureau. (Travail du Laboratoire de médecine expérimentale.) — Bordeaux, impr. J. Pechade, 1947. In-8°, 130 p., fig.

(*Thèse Médec. Bordeaux. 1946-1947. N° 54.*)

.....

CHABBERT (Yves)

Contribution à l'étude du dosage de la pénicilline en clinique. Applications de la méthode B. Sureau. (Travail du Laboratoire de médecine expérimentale.) — Bordeaux, impr. J. Pechade, 1947. In-8°, 130 p., fig.

(*Thèse Médec. Bordeaux. 1946-1947. N° 54.*)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536508_0093

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1946-1947 — N° 54

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DOSAGE DE LA PENICILLINE EN CLINIQUE

Applications de la Méthode B. Sureau

(Travail du Laboratoire de Médecine expérimentale)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Mercredi 23 Avril 1947

PAR

Yves CHABBERT

Né le 1er Avril 1921, à Caudéran (Gironde)

Examinateurs de la Thèse : MM. DUPERIÉ, professeur, *Président* ; AUBERTIN, professeur ; JOULIA, professeur, ; SARIC, agrégé — *Juges*

BORDEAUX
IMPRIMERIE J. PECHADE
20, rue Margaux, 20

1947

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. DUPÉRIÉ

ASSESSEUR : M. LABAT

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DENIGÈS, DUPOUY, A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ANDERODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET. PERY,

PROFESSEURS :

MM.		MM.	
Clinique médicale.	DUPÉRIÉ.	Zoologie et parasitologie	SIGALAS.
id.	CREYX.	Médecine expérimentale	AUBERTIN
Clinique chirurgicale et Gynécologique	CHARRIER	Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX.
Clinique chirurgicale	PAPIN.	Clinique chirurg. infantile et orthopedie	LOUBAT.
Clinique d'Accouchements	RIVIÈRE.	Clinique des maladies infectieuses.	DAMADE.
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DE GRAILLY.	Chimie biologique et médicale	MACHEBŒUF.
Anatomie	VILLEMIN.	Physique médicale et pharmaceutique.	N.
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL.	Médec. coloniale et clin. des mal. exotiques	BONNIN.
Hygiène.	PIÉCHAUD.	Clinique des malad. cutanées et syphilitiques.	JOULIA.
Médecine légale et déontologie	DERVILLÉE.	Clinique des maladies des voies urinaires	DARGET.
Electroradiologie et clin. d'électricité médicale.	N.	Clinique des malad. nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Chimie	CHELLE.	Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN
Botanique et matière médicale.	GOLSE.	Toxicologie et hygiène appliquée	LABAT.
Pharmacie	VITTE.	Hydrologie thérapeutique et climatologie.	N.
Physiologie	FABRE.	Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ.
Clin. méd. des mal. des enfants	FONTAN.		

PERRENS (Maladies mentales). FAUGÈRE (Obstétrique)

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.		MM.	
Anatomie	DUFOUR.	Chirurgie générale	MAGENDIE.
Physiologie	N.	id.	POUYANNE.
Médecine Générale	N.	id.	LAUMONIER
id.	N.	Obstétrique	N.
id.	N.	id.	MAHON.
id	BROUSTET.	Ophtalmologie	BESSIERES
id.	N...	Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
id.	SARIC.	Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT.
id.	DUBARRY.	Physique médicale	N...
id.	F.-J. TRAISSAC	Chimie Générale pharmaceutique et toxicologie.	CASTAGNOU.
Chirurgie Générale	N...	Histoire naturelle pharmaceutique	GIRARD.
id.	MASSÉ.	Pharmacie	MESNARD.
id.	N...	id.	N.
		Histoire natur. médicale et parasitologie.	N.
		Histologie	N.

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.		MM.	
Médecine opératoire	MASSÉ.	Botanique	GIRARD.
Accouchements	MAHON.	Cryptogamie.	GIRARD.
Puériculture.	FAUGÈRE.	Pharmacie galénique	MESNARD.
Zoologie et parasitologie	N...	Bactériologie.	MOUREAU.
Urologie	N...	Physiologie	Mlle ROUGIER
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.	Chimie biologique	TAYEAU.
Ophtalmologie	N...	Parasithologie et biologie appliqué	PAUTRIZEL.
Anatomie	J. BEAUVIEUX	Pathologie chirurgicale	VILLAR
Chimie minérale	CASTAGNOU.		N.
		Electroradiologie-	CAILLON.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

A MA GRAND-MÈRE

A qui je dois tout ce que je suis.

Puissai-je en cette circonstance leur manifester mon affection et ma reconnaissance.

A LA MÉMOIRE DE MA GRAND-MÈRE

A MON GRAND-PÈRE

En témoignage de mon affection pour eux.

A MA TANTE, Simone de CUVERVILLE

A MA FIANCÉE

En gage de la route que nous ferons ensemble.

A MES AMIS

A MES CAMARADES D'INTERNAT

AUX ROUTIERS DU CLAN Jacques de NOIRMONT

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ ET DES HOPITAUX

A Monsieur le Docteur E. DUBOURG

Médecin des Hopitaux

Mon cher Maître,

Toutes les étapes de ma vie à l'Hôpital se sont passées auprès de vous. Stagiaire, externe puis interne dans votre service, vous m'avez toujours accueilli avec une bienveillante affection. Votre clarté d'esprit, la sûreté de votre jugement clinique, votre bonté, le soin très humain que vous apportez à chacun de vos malades auront été pour moi le plus bel exemple des qualités du médecin. Mais aussi votre souci constant de vous appuyer sur un laboratoire qui soit véritablement au service du malade sera toujours pour moi une leçon que je n'oublierai pas. Que ce travail que j'ai essayé d'accomplir avec cet esprit soit un faible témoignage de ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur MOUREAU

Chargé de cours et chef de travaux pratiques
a la Faculté de Médecine de Bordeaux
Médecin biologiste des Hopitaux
Officier de l'Instruction publique
Croix de Guerre

Qui nous a guidé dans ce travail et que nous remercions pour ses conseils et la sympathie qu'il nous a toujours témoignée.

A Monsieur le Docteur J. TRIAUD

Médecin principal de la Marine
Chevalier de la Légion d'Honneur

A NOTRE JURY DE THÈSE

Monsieur le Professeur agrégé SARIC

Médecin des Hopitaux

Monsieur le Professeur JOULIA

Professeur de clinique des maladies cutanées et syphylitiques

Officier d'Académie

Monsieur le Professeur E. AUBERTIN

Professeur de Médecine expérimentale

Médecin des Hopitaux

Croix de Guerre

Officier de l'Instruction publique

Chevalier de l'ordre de la Santé publique

Mon cher Maître,
En vous remerciant profondément, pour l'accueil bienveillant que vous m'avez réservé.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur DUPÉRIÉ

Doyen de la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Bordeaux
Professeur de Clinique médicale
Médecin des Hopitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur
Chevalier de l'ordre de la Santé publique
Officier de l'Instruction publique

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

En témoignage de notre profonde gratitude pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son service où nous avons effectué une grande partie de ce travail.

AVANT-PROPOS

L'arrivée des troupes américaines, en mai 1945, *au Stalag VII B où nous étions depuis deux ans à titre médical, nous apporta, en même temps qu'une libération ardemment désirée, des renseignements plus précis sur la Pénicilline, ce médicament récemment découvert et jusqu'alors à peu près inconnu de nous, dont l'utilisation dans l'armée alliée donnait de remarquables résultats.*

Nous avions commencé nos études de Médecine à l'époque où l'apparition des Sulfamides avait donné son plus grand essor à l'ère de la Chimiothérapie ; mais peu à peu leur action s'était montrée moins étendue qu'on ne le pensait, et pendant les quelques années où nous avions pu traiter directement des malades, les échecs s'étaient accumulés, nombreux.

Aussi la Pénicilline fut-elle accueillie avec joie. L'expérience antérieure avait déjà fortement ancré en nous cette idée que la course entre l'activité d'un antibiotique et le microbe, traduite par une véritable inflation progressive des doses, n'était pas une vue de l'esprit, ni une simple utopie.

Elle nous avait également appris que si l'on veut profiter longtemps du plein effet thérapeutique d'un produit, un contrôle sévère doit en être assuré.

Interne de M. le Professeur Joulia, *nous avons pu constater la véracité de cette opinion et sa portée, en surveillant de très près les blennorrhagiques en traitement dans son service.*

Par la suite, accueilli dans son laboratoire par le docteur Moureau, *Chef de Travaux pratiques de la Faculté de Médecine de Bordeaux, et guidé par lui à travers l'étude de la bactériologie avec une extrême bienveillance dont nous voulons respectueusement le remercier ici, nous nous sommes attaqué en décembre* 1945 *au problème des dosages de la Pénicilline. Tout au long de ce travail, il nous a prodigué conseils techniques et encouragements.*

Grâce à l'amabilité des chefs de service des Hôpitaux et de nos camarades d'Internat, que nous assurons de notre reconnaissance pour l'aide qu'ils nous ont apportée, grâce aux nombreux prélèvements qu'ils nous ont envoyés, il nous a été possible d'utiliser largement en clinique courante la méthode du docteur Sureau.

Nous remercions tout particulièrement le docteur R. Martin, *médecin-chef de l'Hôpital de l'Institut Pasteur, et le docteur* B. Sureau, *Médecin-Assistant, pour l'accueil bienveillant qu'ils nous ont réservé, ainsi que M^lle^* A. Bourcard, *Chef du Laboratoire, qui a bien voulu nous expliquer cette méthode et nous donner les détails sans lesquels, bien souvent, une technique ne peut être vivante.*

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DOSAGE DE LA PENICILLINE EN CLINIQUE

APPLICATIONS DE LA MÉTHODE DE B. SUREAU

(Travail du Laboratoire de Médecine expérimentale)

INTRODUCTION

Nous nous proposons, au cours de ce travail, d'étudier les principales méthodes de titrage biologique de la Pénicilline, appliquées à l'étude de la concentration dans les liquides organiques, et de discerner celles qui sont le plus qualifiées pour l'utilisation clinique.

Toutes les méthodes de titrages biologiques se réfèrent au phénomène de la bactériostase d'un germe sensible à la Pénicilline à une concentration donnée, mais leurs modalités varient.

Elles peuvent se diviser grossièrement en deux groupes :

— Un premier groupe de titrages résulte de l'application de la constatation princeps de Fleming, c'est-à-dire la constatation d'une aire d'extinction autour d'un foyer diffusant de la Pénicilline à la surface d'une gélose ensemencée.

C'est la méthode classique de Heatley, si utilisée jusqu'à présent dans l'industrie, avec ses nombreuses variantes techniques.

— Le deuxième groupe comprend les méthodes par dilution en milieu liquide. On réalise des taux de plus en plus faibles du liquide primitif et on observe le tube à partir duquel la croissance cesse d'être inhibée.

Du taux de la dilution, soit en se référant à la définition de l'unité Oxford, soit par comparaison avec une gamme étalon, on déduit le taux de ce liquide.

Ce phénomène de la bactériostase peut être mis en évidence de plusieurs manières ; soit directement, à l'œil nu ou au moyen d'un photomètre, soit indirectement, par l'arrêt d'un caractère biologique ou chimique de la croissance microbienne, tel que l'hémolyse ou la fermentation d'un sucre.

Toutes ces méthodes sont susceptibles d'être effectuées avec des germes différents, pourvu que la sensibilité de ceux-ci à la Pénicilline ne soit pas susceptible de subir de trop grandes variations.

Ce sont celles, en particulier, qui nous semblent pouvoir être le mieux utilisées en clinique pour le titrage des liquides organiques, que nous allons rapidement passer en revue.

Nous exposerons plus longuement la méthode de dilution en milieu glucosé en présence d'un indicateur de pH, de B. Sureau, F. Depin et O. Schurr, à laquelle nous nous sommes arrêtés et qui nous a servi pour la majorité de nos titrages cliniques.

Nous verrons ensuite les différents taux de pénicilline obtenus par cette méthode, dans le sang, le liquide céphalo-rachidien, et quelques exsudats, suivant les différentes voies d'introduction.

Nous terminerons par quelques aperçus sur l'utilité de l'étude de la courbe de Pénicillinémie associée avec le calcul de la Pénicillosensibilité du germe pour la conduite du traitement.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES DE DOSAGE

Nous ne donnerons pas les détails précis de toutes les techniques. Certaines étant actuellement devenues classiques, d'autres n'ayant qu'un intérêt historique. Nous nous attacherons surtout à détailler les microméthodes susceptibles d'être utilisées en clinique dans les liquides organiques. Toutes ces méthodes ont été conçues pour titrer en unités, soit un échantillon donné de Pénicilline par rapport à un germe étalon, soit la sensibilité d'un germe inconnu vis-à-vis d'une Pénicilline de titre connu, de petites modifications permettant de passer de l'une à l'autre.

Ces dosages se groupent en deux grandes catégories : Les méthodes de diffusion en Agar et les méthodes de dilutions sériées.

I. — METHODES DE DIFFUSION EN AGAR

Application au titrage d'une pénicilline inconnue

Méthode des cylindres — Dosage Heatley

Cette méthode a été décrite pour la première fois par Florey et ses collaborateurs dans « The Lancet » : « Further observations on Penicillin ». Exposée en détail en-

suite par Heatley, elle est actuellement décrite dans tous les livres traitant de la Pénicilline. Le détail en est notamment donné dans l'ouvrage de R. Martin, F. Nitti, B. Sureau et J. Berrod auquel nous l'empruntons avec quelques modifications apportées par différents auteurs.

Principe : Cette méthode se base sur la rapide diffusion de la Pénicilline dans certains gels tels que la gélose nutritive par exemple. On place des tubes en verre, porcelaine ou métal sur une surface de gélose préalablement ensemencée avec un microbe sensible à la Pénicilline. Ces tubes sont remplis de solutions de Pénicilline de titres différents. La Pénicilline diffuse dans l'épaisseur de la gélose, tandis que cette même gélose constitue un filtre pour les germes qui peuvent être contenus dans le tube. Après un séjour de 18 à 24 heures à l'étuve à 37° on observe les faits suivants :

La surface de la gélose présente une culture microbienne unie et homogène.

Les tubes contenant les solutions de Pénicilline sont entourés d'une auréole claire dans laquelle tout développement microbien est arrêté.

Le diamètre de cette zone d'inhibition est, dans certaines limites et pour certaines conditions expérimentales, proportionnel aux concentrations de Pénicilline placées dans les tubes. Une Unité de Pénicilline provoque une zone d'inhibition de 22 mm. environ.

Technique du dosage

Matériel

I. Boîtes de Pétri de modèle courant (2 cm. de profondeur sur 9 cm. de diamètre). Il est important que le fond de ces boîtes soit parfaitement plan.

II. Cylindres : On utilise trois types différents :

— Les cylindres de porcelaine proposés par Heatley qui ont 10 mm. de longueur sur 8 mm. de diamètre exté-

rieur et environ 6 mm. 8 de diamètre intérieur. Les deux extrémités du tube sont rôdées.

— Les cylindres en verre Pyrex de 10 mm. de long sur 8 mm. de diamètre extérieur et 5 mm. 4 de diamètre intérieur.

— Les cylindres en aluminium ou en acier inoxydable pouvant être biseautés à la partie inférieure. Le biseau fait un angle de 30 à 40°.

Des surfaces planes et lisses sont nécessaires pour obtenir un contact étanche avec la gélose.

III. Milieux :

Milieu 1 : Peptone glucosée pour la culture du staphylocoque étalon.

Peptone Uclaf	20 grs.	
Chlorure de sodium	5 grs.	pH 7,5
Glucose	2 grs	
Eau. q.s.p.	1.000 cc.	

Milieu 2 : Gélose nutritive servant à la préparation des boîtes :

Autolysat de levure Byla ..	3 grs.
Peptone Uclaf	6 grs.
Chlorure de Sodium	5 grs.
Glucose	1 gr.s
Gélose	15 grs.
Eau. q.s.p.	1.000 cc.

Dissoudre à chaud le sel, la peptone et l'autolysat de levure dans l'eau. Ajouter la gélose et stériliser à l'autoclave à 120° pendant 30'. Le pH avant stérilisation doit être ajusté à 7,6. Filtrer sur papier Chardin dans l'autoclave ouvert. Ajouter le glucose dissous dans 10 cc. d'eau. Bien mélanger. Répartir dans des tubes à raison de 20 cc. par tubes. Stériliser à 110° pendant 30 minutes.

IV. Souche microbienne : Comme microbe d'essai, on utilise en Angleterre et dans quelques laboratoires des Etats-Unis la souche de staphylocoque H d'Oxford n°

6-571 de la « National Collection of type Culture » de Londres. La conservation de la souche doit se faire en gélose, on fait une première culture de vingt-quatre heures sur milieu n° 1 en partant de cette souche. Puis, à partir de celle-ci une deuxième de vingt-quatre heures sur le même milieu. C'est ce deuxième repiquage, qui dilué au 1/100^{me} servira pour l'ensemencement.

V. Solution étalon de Pénicilline : Elle est préparée toutes les semaines en partant d'une ampoule de Pénicilline en poudre. La solution est faite dans un tampon phosphaté ayant la composition suivante :

Solution I : Phosphate monopotassique.....	136 grs.
Eau distillée q.s.p..	1 litre
Solution II : Phosphate disodique cristallisé..	358 grs.
Eau distillée q.s.p..	1 litre

On mélange 612 cc. de la solution I et 100 cc. de la solution II. Une partie de cette solution mère est diluée dans neuf parties d'eau distillée pour une solution tampon de pH = 6. Cette solution est saturée avec du chloroforme et du toluène pour la stériliser. Elle peut se conserver vingt-quatre heures. Ce tampon renferme approximativement 1,4 % de sels.

Préparation des boîtes :

On coule dans une boîte de Pétri stérile, 20 cc. de milieu gélosé, formule n° 2. On laisse durcir la gélose par refroidissement et on étale sur cette première couche un film de gélose liquide ensemencée avec du staphylocoque doré. On pose les cylindres sur la surface gélosée et on les remplit avec des solutions de Pénicilline de titre connu.

Temps du dosage :

Premier temps : *Remplissage des boîtes.*

Faire fondre au bain-marie à ébullition des tubes de milieu n° 2. Verser le contenu de chaque tube dans une

boîte de Pétri stérile. Laisser refroidir sur une surface plane pendant un quart d'heure. Placer ensuite les boîtes dans une étuve à 42° pendant deux heures.

Deuxième temps : *Ensemencement.*

Il peut se faire de deux manières :

1° Faire fondre au bain-marie des tubes de milieu n° 2. Laisser refroidir. Dès que l'eau aura atteint une température de 48-50°, ensemencer avec 0 cc. 2 de la culture de staphylocoque étalon préparée comme nous l'avons indiqué. Agiter soigneusement pour rendre le mélange homogène. Prélever cette gélose ensemencée avec une pipette de 10 cc. stérile tiédie à la flamme d'un bec Bunsen. Mettre 2 cc. de cette gélose sur des boîtes préalablement préparées et chaudes. Etaler rapidement en agitant d'une manière circulaire et laisser refroidir à plat.

2° On verse avec une pipette Pasteur, sur la plaque d'Agar préparée, une quantité suffisante de culture en bouillon de 16 à 24 h. du staphylocoque standard. Cette culture peut être diluée au 1/10e, 1/100e, 1/1.000e suivant les résultats obtenus, mais l'inoculum doit être le même pour une série de dosages. On balance la plaque d'un côté et de l'autre, puis on la place inclinée à environ 20° par rapport à l'horizontale, de façon que l'excès s'accumule dans une petite zone du bord où on le réaspire avec la pipette. On marque au crayon gras sur la plaque la dite zone. Avec cette méthode, il conviendrait de faire le titrage sur quatre plaques différentes en changeant pour chacune d'elles la position de l'échantillon à titrer. Celui-ci serait placé à 90° de la position qu'il occupait sur la plaque précédente de façon qu'un cylindre différent soit situé chaque fois dans la zone où l'on a réaspiré.

Troisième temps : *Pose des cylindres.*

Les cylindres qui sont conservés dans des tubes en verre et stérilisés à l'autoclave à 120°, seront placés à ce moment sur la surface de la gélose. Chaque cylindre sera

prélevé avec une pince stérile et légèrement chauffé à la flamme à sa partie inférieure. Il doit être appliqué sur la surface du milieu en le faisant tomber d'une hauteur de 5 mm. pour qu'il s'enfonce légèrement. Coghill emploie une gélose à 2 % d'Agar où les cylindres s'appliquent naturellement sans flambage, ni pression. Ces cylindres seront placés à 1 cm. 5 de la périphérie de la boîte, à raison de cinq par boîte.

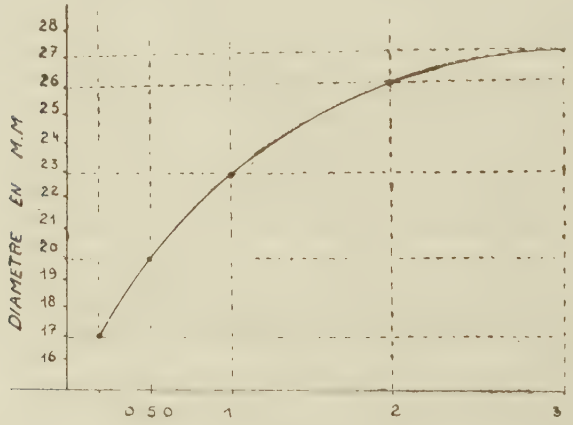
Quatrième temps : *Remplissage des cylindres.*

Avec une pipette stérile à tétine de caoutchouc on remplit jusqu'au ras trois cylindres avec des solutions de titre inconnu de Pénicilline. Les deux autres recevront une solution étalon contenant une unité par cc.

On place à l'étuve à 37° pendant 18 heures. On lit alors les résultats en mesurant à la pointe sèche ou par transparence sur un papier millimétrique, le diamètre des auréoles.

Interprétation des résultats :

Pour avoir le chiffre en Unités Oxford on se réfère à une *courbe standard* préalablement établie.



On dessine les courbes standard en déterminant les diamètres des cercles d'inhibition produits par des solutions

renfermant des quantités d'unités Oxford connues, échelonnées entre 0,25 U.O. et 3 unités par cc.

Approximativement cent zones d'inhibition sont déterminées pour chacune des cinq concentrations 0,25 - 0,50 - 1 - 2 - 3 U.O. par cc. Une fois les courbes standard établies, comme il y a des variations minimes mais réelles pour chaque boîte, on essaie seulement une unité standard dans chaque boîte pour préciser la courbe qui doit être utilisée.

Facteurs influant sur les diamètres des zones d'inhibition

De nombreux facteurs, d'après Schmidt et Meyer sont susceptibles d'influer sur les diamètres. Il est utile de les connaître pour standardiser une méthode dans un laboratoire.

Profondeur de la gélose : Avec 25 cc. pour des boîtes de 10 cm. de diamètre, les disques sont nets, mais avec 15 cc. ils deviennent indistincts.

pH de la gélose : Suivant le pH le diamètre varie. Par exemple, pour une Pénicilline titrant 2 U.O. :

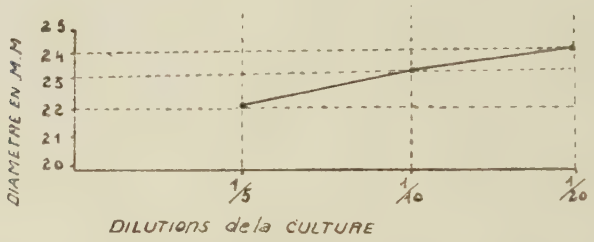
à pH 6. Titre moyen sur 10 dosages 24 mm. 6
à pH 7. Titre moyen sur 10 dosages 23 mm. 1
à pH 8. Titre moyen sur 10 dosages 22 mm. 6

De plus à pH 6 les cercles seraient moins nets qu'à 7.

Variations de la souche : Il importe de conserver la souche dans les mêmes conditions de milieu et de temps de culture à une température donnée.

La souche de staphylocoques H standard du N.C.T.C. de Londres est susceptible de variations. Cowan, expérimentant sur sept échantillons utilisés dans différents laboratoires a trouvé des variations de pousses microbiennes importantes suivant la concentration en Pénicilline et en germes du milieu.

Concentration de l'inoculum : L'augmentation de la dilution de la culture est susceptible de faire croître le diamètre des cercles.



Croissance de l'organisme test : Si l'on place après le dosage les plaques à une température basse pendant quelques heures, il y a naturellement augmentation de la phase de latence et agrandissement des cercles. Une Pénicilline, qui portée immédiatement à 37° aurait donné un cercle de 22 mm., après sept heures de glacière en donnera un de 25 mm.

Pose des cylindres : La régularité de la pose des cylindres et la profondeur à laquelle ils sont enfoncés dans la gélose influent sur les cercles dans une limite difficile à préciser.

On voit qu'il est nécessaire, comme l'avait proposé Hunter, de standardiser les dosages et particulièrement dans un même laboratoire, de fixer sa méthode. Cependant la *précision* de cette méthode est nettement suffisante, d'après Heatley la marge d'erreur ne serait pas supérieure à 20-25 %. Il est certain même que ce taux a été abaissé aux environs de 10 % dans les laboratoires de contrôle pharmaceutique américains où l'on pratique une moyenne de deux à trois cents dosages en triple ou quadruple exemplaires par jour.

Cette méthode a l'avantage de titrer avec une relative facilité un grand nombre d'échantillons. Ceux-ci, de plus n'ont pas besoin d'être stériles. Pour le titrage de Pénicillines de taux complètement inconnus, elle permet d'at-

teindre rapidement la zone sensible. Enfin, elle permet d'éliminer des produits rencontrés fréquemment au cours de la préparation de la Pénicilline tels que la Notatine et la Pénatine qui ne diffusent pas dans l'Agar.

Nous avons dit que ce qui nous intéressait surtout ici était *l'utilisation des méthodes pour le titrage en milieu organique.* Or, la méthode Heatley ne dose pas au dessous de 0,25 U.O. et la majorité des liquides organiques contiennent des quantités nettement inférieures. Cependant, elle garde toute sa valeur pour le dosage des liquides septiques à forte teneur en Pénicilline, notamment c'est une méthode excellent pour le dosage dans l'*urine.* Ce dosage présente une grande utilité soit que l'on veuille récupérer la Pénicilline, soit que l'on veuille établir le bilan d'élimination. La Pénicilline s'altérant rapidement, il est utile de la traiter. Le procédé utilisé par R. Martin consiste à recueillir les urines sur 10 % de tampon M/15 à pH 5,2 additionné de 8-10 cc. par litre d'acétate d'amyle ou de 2 % de chloroforme.

Plusieurs modifications ont été proposées qui portent sur le support du liquide à examiner et le germe.

Méthode des cupules de Fleming

Elle consiste à pratiquer sur une plaque d'Agar déjà ensemencée avec du staphylocoque, des orifices cylindriques avec un perforateur stérile de 6 mm. de diamètre (perce-bouchons stérilisé). Le fond de ces cavités est recouvert d'une goutte d'Agar fondu stérile pour éviter que le liquide ne se répande entre le fond des plaques et le milieu de culture. Dans ces cupules, on place les solutions de Pénicilline et on en mesure l'activité par le diamètre de la zone d'inhibition comme précédemment.

Méthode des disques de papier de V.G. Vincent

C'est la plus simple et la plus commode de toutes. Sur des boîtes ensemencées à l'ordinaire, on pose des disques

de papier filtre de 7 mm. 5 de diamètre, imbibés des solutions de Pénicilline à étudier. Epstein utilise la même méthode avec des disques de papier de un centimètre de diamètre posés sur la gélose contenue dans des grandes boîtes en pyrex de 31 × 26 cm.

Méthode utilisant le B. Subtilis

Exposée en détail par Forster et Woodruf, cette méthode présenterait suivant ces auteurs plusieurs avantages sur les méthodes utilisant le staphylocoque. En effet, la pousse de la souche de staphylocoque en milieu liquide est très irrégulière pour des temps donnés. Elle peut troubler seulement le bouillon ou laisser un gros dépôt après vingt-quatre heures de pousse. Nous avons même constaté que le staphylocoque peut produire une culture à la surface du bouillon qu'il est difficile de dissocier. Bien qu'il soit possible de pallier à ces inconvénients en opérant sur une dilution d'opacité donnée, il est certain que l'entretien de la souche nécessite un soin constant. Le chauffage à 45° pour réaliser le film d'ensemencement altère certains staphylocoques et fait varier le taux d'ensemencement. Cette température est trop près de celle où la gélose se solidifie, ce qui est gênant quand on opère sur un grand nombre de boîtes. Le staphylocoque nécessite une incubation à 37° ce qui amène des gouttes de condensation qui risquent de retomber rendant ainsi le dosage difficile à lire. Enfin, le temps d'étuve modifie les cercles beaucoup plus pour le staphylocoque que pour le B. Subtilis.

Temps d'incubation	Diamètre en mm.	
	Staph. doré	B. Subtilis
17 heures	24,5	17,3
21 heures	25	17,3
46 heures	25,8	17,2

Les auteurs utilisent une souche ne contenant que des spores de B. Subtilis. Cette souche est cultivée en bouillon

pendant 5-6 jours en l'agitant constamment pour éviter la formation du voile et sous courant d'air stérile. Au bout de ce temps, la culture est pasteurisée à 60° pendant trente minutes pour détruire les formes végétatives. La gélose est ensemencée ensuite de manière qu'elle contienne 2×10^5 spores par cc. Le titrage se fait comme dans la méthode Heatley, soit avec des disques de papier, soit avec des cylindres.

Les avantages résident dans la conservation très longue à la glacière de la culture de spores. La température du film d'ensemencement peut être de 55 à 60° donc stérilité plus grande et absence de solidification de l'Agar. La pousse se fait à 30° pendant six heures, d'où rapidité, absence de souillures et de gouttes de condensation. Enfin, les cercles d'inhibition seraient plus nets et mieux visibles.

Application au titrage de la sensibilité d'un germe

Si la méthode Heatley n'est surtout utilisable en clinique que pour doser la Pénicilline de l'urine ou celle des exsudats à forte concentration, elle est, par contre excellente pour déterminer la Pénicillo-sensibilité des germes si importante à connaître. Si l'essentiel de la méthode reste le même, nous verrons que l'ensemencement peut se faire très différemment.

Méthode de la « Cup » en gélose de L. P. Garrod

Nous l'empruntons à un article de L. P. Garrod et B. Sureau illustré notamment de photographies qui mettent nettement en relief les résultats. Le principe se rapproche beaucoup de celui des méthodes utilisées pour le titrage d'une Pénicilline inconnue ; il est toujours basé sur la diffusion de la Pénicilline en gélose et la production de cercles d'inhibition proportionnels à la sensibilité du germe.

Technique : On coule en boîtes de Pétri le milieu approprié à la croissance du germe à étudier, gélose au sang par exemple. Deux rondelles d'environ 8 mm. de diamètre sont découpées sur ce milieu avec un emporte-pièces à bouchons stérile. On dépose à la surface de la gélose l'inoculum à étudier et on l'étale sur toute la boîte. Enfin, avec une pipette Pasteur, une goutte d'une solution faible de Pénicilline est placée dans chacune des « cups ». La concentration de la solution doit être de une unité par cc. pour l'une et de 10 U.O. par cc. pour l'autre.

Fleming recommandait en décrivant ce procédé de sceller le fond des « cups » avec une goutte de gélose afin d'empêcher la Pénicilline de s'infiltrer entre la gélose et le fond de la boîte de Pétri.

On couvre la plaque et l'on met à l'étuve à 37°. Si dans le matériel étudié (du pus par exemple) il existe des bactéries sensibles à la Pénicilline, nous verrons qu'elles ne se développent pas aux alentours des gouttes de Pénicilline et du diamètre de la zone d'inhibition, nous pourrons déduire le degré approximatif de sensibilité. L'emploi de gouttes de concentrations différentes est utile, car s'il existe dans le pus deux germes de sensibilités différentes dont l'un soit très sensible et l'autre peu sensible, la croissance du germe sensible est inhibée aux alentours des deux cupules, tandis que le germe peu sensible se développera autour de la goutte qui contient une U.O. par cc. Cette technique a l'avantage de permettre à la fois d'isoler le ou les germes d'une suppuration et de rechercher approximativement leur sensibilité à la Pénicilline, et cela même dans le cas d'associations microbiennes et sans qu'un diagnostic bactériologique précis ait été fait de l'affection. Il est même possible de chiffrer grossièrement cette sensibilité puisque l'on sait que la sensibilité du staphylocoque standard est de 22-24 mm. pour 1 U.O. par cc. et de 40 mm. environ pour 10 unités.

La cupule peut être placée au centre de la plaque et les germes ensemencés en rayons autour de ce centre en

ensemençant en même temps deux souches de sensibilité connue, l'une très sensible, l'autre très résistante. La longueur de la zone inhibée mesure la sensibilité.

Méthode du canal. « Gutter test » de Fleming

Lasseur, de Nancy, a fait une étude de plusieurs germes par cette méthode et il propose la technique suivante : Dans des boîtes de Pétri de 190 mm. d ediamètre, très planes, on distribue 200 cc. de gélose à 3 % de pH 7,2. Pour éviter des gouttes de condensation inévitables avec une aussi grande masse de gélose, on garnit l'intérieur du couvercle de plusieurs disques de papier filtre. On laisse refroidir pendant environ deux heures pour permettre à la gelée d'être très cohérente et adhérente aux parois du verre afin de faciliter le découpage du canal. Celui-ci est fait à l'aide d'un scalpel stérile qui permet d'enlever une bande médiane de gélose de 20 mm. de large environ. On coule ensuite dans le canal un mélange de gélose et de Pénicilline de titre connu en les portant ensemble à une température entre 40 et 45° degrés, ce qui per met de les mélanger intimement. Deux heures après, on pratique l'ensemencement avec un tampon de coton monté sur un écouvillon stérile légèrement recourbé. Ce procédé assure un ensemencement meilleur que le fil de platine et laisse une trace visible même si les bactéries ne se développent pas. Là aussi, la sensibilité peut être grossièrement chiffrée par la longueur de la zone d'inhibition des stries et on peut comparer la souche à étudier avec des souches de sensibilité connues.

Méthode des disques de papier

Analogue à la méthode de Vincent, cette méthode a été adaptée par Lasseur et ses collaborateurs à l'étude des sensibilités des souches microbiennes. Il emploie des carrés de un centimètre de côté composés de plusieurs épaisseurs de papier filtre réunies par un fil, susceptibles d'ab-

sorber 0 cc. 1 d'une dilution de Pénicilline de titre connu 1 - 10 - 100 U.O.

De toutes ces méthodes, celle des cupules, qui par son ensemencement en masse du produit pathologique à étudier permet à la fois de se rendre compte de la sensibilité de tous les germes et même de les séparer, constitue la méthode de choix en clinique quand on veut donner une réponse rapide. Cependant, quand on possède la souche isolée, la méthode de dilutions que nous verrons plus loin, nous a semblé préférable, car elle permet de fixer le taux d'inhibition minimum et par conséquent la dose thérapeutique avec plus de précision.

II. — MÉTHODES DES DILUTIONS SÉRIÉES EN MILIEU LIQUIDE

Dosage Oxford. Titrage d'une Pénicilline inconnue

Il consiste à faire des dilutions sériées du liquide à examiner avec du bouillon et parallèlement des dilutions de l'étalon de Pénicilline. On ensemence tous les tubes avec une quantité déterminée de staphylocoques dorés et on cultive à 37° de 18 à 24 heures. On prend comme base de calcul la moyenne entre la dilution du tube dans lequel la quantité de Pénicilline est suffisante pour inhiber la croissance bactérienne et celle où l'on constate une légère pousse microbienne.

On exprime en *Unités Oxford* (U.O.) ou « *Unités Florey* » ce pouvoir antimicrobien de la Pénicilline :

Une Unité Oxford est la quantité de Pénicilline qui, dissoute dans 50 cc. de bouillon à base d'extrait de viande inhibe entièrement la pousse d'une souche étalon de staphylocoques, ou encore : la quantité de Pénicilline contenue dans 1 cc. d'une solution tamponnée de Pénicilline dont l'effet est tel que 0,02 Unités par cc., inhibe la crois-

sance d'un staphylocoque choisi une fois pour toutes. On voit donc que, en principe, une Unité Oxford correspondant à la dilution de 1/50^{me}, il serait inutile de faire le dosage comparativement à une solution connue de Pénicilline. En connaissant la dilution limite active d'une Pénicilline à examiner, on obtiendra son titre en Unités Oxford en divisant cette dilution par 50. Cependant, comme le phénomène d'inhibition est susceptible de varier dans certaines limites suivant le milieu et la souche employée, le dosage fait comparativement à une gamme étalon apporte un élément de précision qui n'est pas négligeable.

Technique (1) : Les dilutions se font en eau bidistillée stérile. Le milieu utilisé peut être du bouillon mais en raison des variations possibles, Fleming propose de remplacer le bouillon par une solution de glucose et de peptone.

Le titrage peut se faire en deux temps : un premier titrage lache pour voir la zone de virage et un titrage plus précis.

On fait une première dilution sériée de la Pénicilline à titrer, ramenée au taux approximatif de 1 U.O. par cc., dans de l'eau bidistillée. Un cc. de ces dilutions est ensuite porté dans 9 cc. de milieu que l'on ensemence enfin avec une goutte d'une dilution d'une culture de staphylocoque standard.

N° des tubes ..	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Pen. approx.											
1 U.O. cc.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Eau bid. cc.	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Dilutions.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6

(1) Nous remercions M^{me} Grumbach, de l'Institut Pasteur, qui a bien voulu nous communiquer le détail de cette technique utilisée dans son Laboratoire, ainsi que la souche de staphylocoques Londres, qui nous a permis de faire nos dosages.

Mettre 1 cc. de ces dilutions dans 9 cc. de bouillon.

Titre final :

1/10	1/15	1/20	1/25	1/30	1/35	1/40	1/45	1/50	1/55	1/60

Ensemencer. Etuve à 37°. 24 heures.

La lecture se fait par rapport à une gamme étalon identique réalisée avec une Pénicilline de titre connu.

Pour obtenir le coefficient du titre de la solution de Pénicilline inconnue, on divise le titre de la solution par celui de la Pénicilline étalon. On divise donc le titre de la dilution du premier tube qui n'a pas poussé (de cette solution) par le titre de la dilution du premier tube qui n'a pas poussé de la Pénicilline comme étalon.

Exemple : Si pour l'étalon c'est le tube 4 qui n'a pas poussé et que pour la solution à titrer ce soit le tube 6 ; on divise 1/35 (T. 6) par 1/25 (T. 4) soit 35/25 = 1,4. Ce qui représente le coefficient de l'Unité de la Pénicilline à titrer.

On multiplie ce coefficient par la dilution faite pour obtenir le titre par cc. Soit une dilution au 1/10.000me et un coefficient de 1,4, la solution contient 10.000 × 1,4 = 14.000 U.O. par cc.

Pour faire un titrage plus serré, il suffit, au lieu de passer de 0 cc. à 0,5 cc. d'eau bidistillée, de placer des tubes intermédiaires, avec 0 - 0,1 - 0,2 - 0,3 etc. Le titre au lieu d'être donné à 1.000 U. près, l'est alors à 200 U.O. près pour les Pénicillines en titrant 10.000 au cc.

Méthodes néphélométriques

L'appréciation de la pousse microbienne qui se fait entre 16 et 24 heures, de préférence 18, peut être observée à l'œil dans le cas le plus courant. Mais plusieurs auteurs ont cherché à rendre la lecture plus précise en la mesurant au photomètre.

C'est Forster qui le premier fit l'étude turbidimétrique de l'inhibition par la Pénicilline. Joslyn, en 1944, compare deux séries de tubes contenant l'un une Pénicilline étalon, l'autre la Pénicilline de titre inconnu ensemencée avec une culture de streptocoque et maintenue à 37° pendant quatre heures. Il mesure l'opacité au colorimètre photo-électrique. La comparaison des deux courbes donne la teneur en U.O.

Bonnet-Maury avec le *biophotomètre enregistreur de Bonnet-Maury et Walen* étudie de façon complète l'évolution de l'opacité des tubes au cours d'un titrage. La photométrie permet de définir de façon précise la dilution limite ; la densité optique du bouillon limpide étant de 0,100 environ, on considère qu'une augmentation de 10 %, soit 0,110 correspond à une pousse difficilement appréciable à l'œil. Cependant, il n'existe pas de dilution limite vraie. Celle-ci varie suivant l'heure à laquelle l'observation est faite et si l'on attend suffisamment tous les tubes finissent par pousser. D'où l'importance de l'heure de la lecture qui doit être fixée exactement. De plus, le phénomène de la croissance bactérienne en milieu contenant de la Pénicilline ne se rapproche pas de la courbe habituelle. Bonnet-Maury a montré qu'après une croissance initiale, il y a lyse, puis prolifération post-lytique. Ces différentes phases étant du reste très variables suivant le nombre de germes ensemencés. Avec des concentrations faibles, c'est uniquement la phase de croissance post-lytique qui est notée.

Ces méthodes de dilution en raison de la quantité de liquide qu'elles nécessitent (difficile à se procurer avec les liquides organiques), en raison aussi des très faibles concentrations contenues en général dans ces liquides, ne peuvent pas être employées telles qu'elles. Ce sont elles qui donnent pourtant le maximum de *précision* que l'on peut attendre de ces titrages biologiques. Bonnet-Maury rapporte qu'en opérant convenablement, la méthode de

dilution donne des résultats corrects de 6 à 11 % près. Pour l'établissement de l'étalon international, l'écart entre les titrages de huit laboratoires n'a pas dépassé 4 %.

Titrage de la pénicillosensibilité d'un germe

Si elle n'est pas utilisée directement en clinique, la méthode de dilution a une application intéressante dans la mesure de la sensibilité d'un germe donné. Nous disons pénicillo-sensibilité, et non pas pénicillo-résistance, ce terme pouvant créer une confusion. Toute souche possède une sensibilité normale à la Pénicilline, la résistance à un agent thérapeutique étant un phénomène anormal. Ainsi les diverses souches de gonocoque sont inhibées à un taux connu variable du reste dans certaines limites, si l'on isole un gonocoque qui montre une sensibilité cent fois supérieure, cette souche sera dite pénicillo-résistante, par analogie à ce qui a été trouvé pour les sulfamides.

La sensibilité des germes à la Pénicilline est actuellement bien connue. Plusieurs tableaux ont été établis par Abraham, Chain, d'une part, et Hobby, Meyer, Chaffee d'autre part. Il est aussi actuellement très classique de dire que le même germe est susceptible d'avoir des sensibilités très différentes suivant la souche.

Expérimentalement, on a pu faire varier considérablement cette sensibilité. In vitro, Abraham en augmentant progressivement la concentration en Pénicilline du milieu de culture, a pu obtenir une souche de staphylocoques mille fois plus résistante que la souche témoin. Et cette résistance semblait acquise et transmissible. Tood, Turner, Drew rendirent la souche de staphylocoque étalon trois mille fois plus résistante, mais celle-ci ne se maintiendrait pas. Rake, après cinquante-cinq passages sur des milieux, contenant des quantités insuffisantes de Pénicilline pour les inhiber, augmentèrent trente fois la résistance de pneumocoques de type III. In vivo, Schmidt

et Sesler ont infecté des souris avec des pneumocoques et les ont traité avec des doses sous thérapeutiques. Ils ont pu isoler après six passages, des souches très résistantes et qui le restaient.

En clinique, parmi les souches isolées chez des malades, la sensibilité à la Pénicilline est un facteur extrêmement variable. L. P. Garrod et B. Sureau relatent la sensibilité de quinze souches de streptocoques isolés du sang d'endocardites bactériennes. Elle est très variable, trois se montraient plus sensibles que la souche de staphylocoque standard qui, elle, était inhibée par 0,04 U.O. Quatre avaient la même sensibilité, huit ayant une sensibilité allant de 0,06 U.O. à 0,50 U.O. Scott Thomson a trouvé en 1943 4 % de staphylocoques pénicillo-résistants dans les plaies. Jean V. Cooke découvrit des souches de méningocoques résistantes. De très nombreux exemples ont pu être apportés de ce phénomène. On conçoit que la connaissance, chaque fois qu'il sera possible de la déterminer, du taux minimum pour inhiber la croissance du germe du malade est un facteur essentiel qui conditionnera toute la thérapeutique. Un germe qui ne serait inhibé par exemple qu'à des concentrations de 0,50 U.O., chez un malade traité par les doses habituelles de 20, 40, 50.000 U.O. toutes les trois heures, ne se trouvera dans les conditions requises pour être inhibé qu'à peine une demi-heure après chaque injection ; le reste du temps, il se trouvera dans des doses sous-thérapeutiques où il pourra constituer une pénicillo-résistance héréditaire qui le mettra désormais hors d'atteinte de la Pénicilline. On voit donc, dès maintenant, que le calcul de cette sensibilité et celui des concentrations organiques peut être d'un grand secours pour fixer les doses et les voies d'introduction.

Principe : Le principe est très simple, il consiste à comparer deux séries de tubes contenant des concentrations décroissantes de Pénicilline, ensemencés l'un avec le staphylocoque étalon, l'autre avec le microbe à étudier. Le rapport des dilutions donne un indice.

Le premier temps consistera, à partir d'une hémoculture, d'un liquide pleural, d'un liquide de broncho-aspiration, d'isoler le germe pur et d'obtenir sa culture dans le milieu qui lui conviendra le mieux, en 18 à 24 heures au maximum. Nous avons, en effet, vu l'importance de l'heure de la lecture dans la méthode ; il faut donc que le germe pousse visiblement à peu près dans le même temps que le staphylocoque qui servira de test. La méthode n'a de valeur que si les germes se trouvent dans un milieu assez riche pour qu'ils poussent aussi bien que le test. Il ne faut pas non plus que le staphylocoque se trouve dans des conditions anormales, on est donc en droit d'utiliser un milieu différent pour le staphylocoque étalon et pour le germe : Bouillon simple pour le staphylocoque, milieu T pour un pneumocoque par exemple. Ce qui importe n'étant pas l'identité des milieux, mais des temps de croissance.

Technique :

1° Faire une dilution à 10 U.O. par cc. d'une Pénicilline de titre connu.

2° Prendre deux séries de huit tubes. Le premier tube contenant 9 cc. de milieu, les sept suivants 5 cc.

3° Porter un cc. de la dilution de Pénicilline dans le premier tube de chaque série. Agiter.

4° Porter 5 cc. du premier tube dans le second. Agiter. Puis 5 cc. du second dans le troisième. Agiter. Ainsi de suite jusqu'au huitième.

5° Ensemencer la première série avec une goutte d'une dilution au 1/100^{me} d'une culture en 24 heures en bouillon de la souche de staphylocoque étalon.

6° Ensemencer la deuxième série avec le germe à étudier.

Les dilutions de Pénicilline dans les tubes se répartissent ainsi :

N° des tubes.	1	2	3	4	5	6	7	8
Taux en U.O.	1	0,50	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015	0,007

Porter à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures.

Dans le cas où plusieurs germes à étudier pousseraient bien dans le même milieu, une fois réalisée la seconde gamme de dilution de la Pénicilline, on peut répartir le contenu de chaque tube dans des tubes à hémolyse stériles à raison de 1 cc. par tubes. La pousse y est très lisible.

Au bout de 18-24 heures, on voit qu'il y a inhibition jusqu'à une certaine concentration et pousse au-delà ; on prend le titre moyen entre celui qui n'a pas poussé et celui qui a poussé. Il suffit de diviser le titre moyen du germe à étudier par celui de l'étalon pour obtenir un Index qui a été appelé Index de résistance par Lichtwitz et Bernal. Nous préférons le terme *Index de sensibilité* qui évite la confusion que nous avons indiquée plus haut.

On sait que l'unité Oxford a été fixée par Florey de telle façon que l'inhibition se produise à 0,02 U.O. par cc. On pourrait donc se passer de faire la série ensemencée avec le staphylocoque. Mais les variations de la souche, du titre de la Pénicilline servant aux dilutions, et, des milieux, fait varier le chiffre de 0,06 à 0,015. Cette série est donc nécessaire.

S'il faut la même quantité de Pénicilline pour inhiber la souche inconnue et la souche étalon, on dira que la sensibilité de la souche est de 1. Si pour l'étalon, il a fallu 0,02 U.O. et pour la souche 0,10 pour les inhiber, on dira que l'*Index de sensibilité* est de 5.

D'après ces auteurs, les streptocoques de la maladie d'Ossler seraient susceptibles d'être atteints par le traitement lorsque leur index de résistance se situe entre 1 et 5. Au dessus, il serait inefficace. Cette constatation vaut à peu près pour tous les germes. Cependant, nous croyons qu'elle est surtout due au fait que des concentrations permanentes supérieures à 0,10 U.O. sont difficiles à obtenir dans le sang.

Nous verrons plus loin quelques exemples de sensibilités calculées par cette méthode.

Micro-méthodes de dilution

Méthode des « Slide Cells » de Fleming

Dérivant d'une technique de Wright, cette méthode permet de détecter de très faibles quantités de Pénicilline telles qu'on les rencontre dans les liquides organiques. Elle consiste à délimiter avec des bandes de papier paraffiné de petites cellules sur une lame de verre chauffée dans la flamme d'un bec bunsen. On les remplit avec une micro-pipette et l'on recouvre d'une seconde lame légèrement chauffée aussi. On lute le tour à la paraffine pour éviter l'évaporation. On a ainsi de très petites quantités étalées sur une surface assez large que l'on pourra ensuite facilement examiner.

Nous décrirons le détail de cette technique dans les techniques avec hémolyse, car c'est cette modification qui est employée actuellement par Fleming. Dans sa technique primitive, il effectuait des dilutions du sérum à examiner sous un volume de 50 mm³ que l'on ensemençait ensuite avec 2 mm³ d'une culture de staphylocoque standard diluée au 1/5.000me. Les cellules refermées étaient placées à l'étuve. Les germes croissent en colonies séparées que l'on distingue facilement. Il ne faudrait ajouter pas plus de 15 à 50 staphylocoques vivants, de manière qu'il n'y ait que 15 à 50 colonies sur chaque cellule. C'est en raison des difficultés d'ensemencement que cette méthode a été abandonnée.

Technique de Garrod

L. P. Garrod propose une technique simplifiée. On ponctionne avec une aiguille de Franke, on recueille le sang dans un tube capillaire stérile, on le laisse coaguler et on le centrifuge. Une goutte de 5 à 10 mm³ de sérum à examiner est placée à une extrémité d'un porte-objet stérile sur lequel on a mis au préalable, à une distance

convenable, trois gouttes égales à la première de sérum normal (sérum sanguin d'une personne saine non traitée à la Pénicilline). On dilue le sérum à examiner au demi et au quart avec une seconde goutte du sérum à examiner et les deux premières du sérum normal. La troisième goutte du sérum normal servira de contrôle.

Les dilutions obtenues sont donc :

1 — 1/2 — 1/4 — Témoin.

Chaque goutte est ensemencée avec une petite quantité de staphylocoque doré, souche H, c'est-à-dire avec 0,5 mm³ d'une culture sur bouillon de 16 à 24 heures diluée au 1/1.000me (très petite anse). Chaque goutte ensemencée est recouverte avec une lamelle couvre-objet stérile et scellée à la paraffine ou à la vaseline et mise à l'étuve pendant quatre heures. On peut faire une série semblable en partant d'une goutte de Pénicilline titrant 1 U.O.

Aucune colonie ne se développe dans les alvéoles du porte-objet qui contiennent suffisamment de Pénicilline. Quand la concentration est presque inhibitrice, le nombre des colonies est inférieur à celui de la goutte de contrôle. Quand la concentration est de l'ordre de la moitié au moins du minimum requis pour l'inhibition complète, on comptera approximativement autant de colonies que dans la goutte de contrôle. L. P. Garrod estime que la concentration de Pénicilline correspondant à une inhibition complète dans l'alvéole avec du sérum pur et, partielle avec le sérum dilué au 1/2, doit être considérée comme satisfaisante si l'infection traitée n'est pas moins sensible que le staphylocoque standard. Elle est probablement celle qu'il faut pour obtenir un bon effet thérapeutique.

Méthode des tubes capillaires de Fleming

On mesure 25 mm³ de sérum, dilué ou non, on le mélange avec 2,5 mm³ de culture de staphylocoque dilué au

1/1.000me et on introduit les mélanges dans des tubes capillaires de telle façon que les colonnes de liquide soient de 5 cm. environ. On ferme les capillaires et on les pose horizontalement dans l'étuve. On apprécie ensuite le développement. Cette technique a aussi été modifiée pour être employée avec comme témoin l'hémolyse produite avec un streptocoque. Ce qui donne une lecture meilleure.

Méthodes hémolytiques

Dans toutes les méthodes que nous avons vues depuis le début, le phénomène observé était la pousse microbienne saisie directement soit par augmentation de l'opacité du milieu, soit par observation directe des colonies ; dans les méthodes que nous allons voir maintenant, la pousse est saisie indirectement à l'aide d'un indicateur.

Méthode de Wilson

On utilise l'hémolyse comme indicateur de titrage. La technique, ne demandant pas plus de trois heures à trois heures et demie, n'a pas besoin d'être aseptique.

Technique : On dilue l'échantillon de telle façon qu'il contienne approximativement 1 U.O. par cc. et on effectue ensuite des dilutions sériées en bouillon. On prend un cc. de chaque solution, on les place respectivement dans un tube à hémolyse et on ajoute à chacun 0,2 cc. d'une suspension contenant 500 à 700 $\times$ 10^6 streptocoques du groupe *a B* hémolytique et 0,8 cc. d'une suspension à 5 % d'hématies de mouton ; on mélange et on met au bain-marie pendant trois heures. On centrifuge et on examine l'hémolyse. Pour éviter la présence d'hémolysines préformées, on cultive sur Agar et on lave avec du bouillon avant l'emploi. Le calcul se fait par rapport à une gamme étalon.

Rake en faisant les dilutions en milieu au cœur de bœuf et en employant une souche spéciale de streptoco-

que a réduit le temps de dosage à 55-90 minutes, à condition d'ensemencer avec des germes en état de division active.

Méthode de Rammelkamp

Rammelkamp utilise un streptocoque hémolytique particulièrement sensible. La méthode consiste à faire deux séries de dilutions. La première, en partant de 0,2 cc. de sérum ou de plasma pur, la seconde, à partir d'une pénicilline contenant 20 U.O. au cc. en eau physiologique. Il ajoute 0,5 cc. de bouillon contenant 1.000 à 10.000 strepto par cc. et une suspension d'hématies à 1 %. On cultive pendant dix-huit heures et on examine les tubes pour rechercher l'hémolyse. L'absence d'hémolyse indique que la culture ne s'est pas développée dans le tube correspondant. La comparaison entre les deux séries permet d'effectuer le titrage. La méthode s'applique à tous les liquides organiques.

Une modification intéressante de cette technique a été mise au point à l'Institut Pasteur, par B. Sureau et F. Depin. Comme les précédentes, elle a pour but de noter le taux de Pénicilline ou de milieu étudié, qui inhibe la croissance d'un streptocoque hémolytique standard.

Technique : On fait dans des tubes à hémolyse stérile deux séries de dilutions croissantes, la première série comporte une échelle de concentrations connues en Pénicilline entre 1/20 et 1/200 ; la deuxième est faite à partir de la solution à titrer (pour le sang entre 1 et 1/100). Les dilutions se font dans du sérum normal. On ajoute ensuite dans chaque tube une goutte de sang défibriné servant d'indicateur et une goutte d'une culture au 1/100 de streptocoque de dix-huit heures en bouillon ascite. On place les tubes sur un agitateur lent qui facilite l'hémolyse. L'appareil est placé dans une étuve à 37° pendant cinq-six heures. Au bout de ce laps de temps, on note la limite inférieure de l'hémolyse dans la série des dilutions

du milieu étudié. Par comparaison avec les dilutions de concentration connue, on calcule la concentration en substance active du milieu à étudier. Toutes ces opérations doivent être faites stérilement, la présence d'autres micro-organismes pouvant annihiler l'activité antibiotique de la Pénicilline.

La méthode est applicable à tous les milieux organiques stériles.

Micro-méthodes hémolytiques de Fleming

Après avoir utilisé pendant quelque temps la méthode des « Slide Cells » et celle des tubes capillaires suivant la technique décrite plus haut, en 1944, Fleming, en raison des grandes difficultés d'un ensemencement égal, les transforma en méthodes hémolytiques.

A. « Slide Cells » :

Technique : On prépare sur une lame ordinaire six compartiments délimités par des bandes de papier — (papier de revue faisant 0,2 mm. d'épaisseur) — trempées dans de la paraffine très chaude, dans un mélange de paraffine et d'huile de paraffine ou même dans de la vaseline. Les compartiments font environ 20 mm. de long sur 12,5 mm. de large, ils contiennent à peu près 50 mm³. On recouvre la lame avec une deuxième lame chauffée.

On peut effectuer les dilutions du sérum à titrer de deux manières : D. Heillman les fait dans des tubes à hémolyse en diluant le liquide à examiner avec du sérum physiologique, puis en ajoutant dans chaque tube du milieu, du streptocoque hémolytique et des globules rouges. Il porte ensuite 25 mm³ de chacun de ces tubes dans les cellules. Fleming fait directement les dilutions dans les cellules. On se sert d'une micro-pipette pouvant mesurer 25 mm³, on dépose dans les six cases de la lame 25 mm

de sérum physiologique. Dans la première case, on ajoute 25 mm³ du sérum du malade, on mélange et l'on reporte 25 mm³ dans le seconde, ainsi de suite jusqu'à la dernière (ou l'avant-dernière, celle-ci pouvant servir de témoin). Les titres sont alors de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64. On ajoute à chaque goutte 25 mm³ de sang témoin infecté avec le streptocoque. En l'absence de pipette graduée, on peut se servir d'une goutte de pipette Pasteur, calibrée de façon qu'elle reproduise le volume désirable.

Ce sang témoin défibriné doit être de groupe O pour ne pas provoquer d'agglutination des hématies. De plus, Fleming insiste beaucoup sur le fait qu'il doit être débarrassé de ses leucocytes qui peuvent avoir un effet bactériostatique sur les streptocoques. On peut les éliminer soit par chauffage à 50° pendant trente minutes, soit en le conservant à 4° pendant trois jours, soit en le filtrant sur coton, soit, surtout, en ajoutant 1/1.000 à 1/2.000 de liquoïd. Le liquoïd a de plus l'avantage de rendre inutile la défibrination.

L'ensemencement se fait en ajoutant environ 5 mm³ d'une culture de streptocoque en bouillon par cc. de sang. Il y aurait peut-être intérêt, comme dans la méthode de U. Wilson, de partir d'une culture en gélose et de laver plusieurs fois une émulsion pour éviter les hémolysines préalablement formées.

Pour le remplissage, on fait glisser la lame supérieure qui est ensuite replacée. On scelle enfin très soigneusement les lames avec le mélange employé pour imbiber les bandes de papier afin d'éviter toute évaporation.

La lecture se fait après dix-huit heures d'étuve à 37°. Quand le taux de Pénicilline dans le sérum est suffisant le sang n'est pas hémolysé, mais quand le taux est inférieur, les streptocoques se développent et hémolysent le sang.

Le calcul se fait soit en connaissant le taux nécessaire au développement du streptocoque, soit en faisant une

gamme étalon en remplaçant le sérum par une goutte de Pénicilline titrant 1 U.O. par cc.

B. Tubes capillaires :

Cette méthode consiste à réaliser l'hémolyse dans des tubes capillaires de 0,8 mm. de diamètre et de 3 pouces (7,62 cm.) de longueur. Dans chacun de ces tubes, on introduit par capillarité 25 mm^3 de sérum à examiner ou de ses dilutions mélangées au préalable avec 5 mm^3 de sang ensemencé avec du streptocoque hémolytique. Cela fait, on ferme les extrémités des tubes, on les pose horizontalement sur un porte-objet et on les met à l'étuve à 37° pendant la nuit. Le jour suivant on examine l'hémolyse et le calcul se fait comme à l'ordinaire.

Ces méthodes par hémolyse réalisent un net progrès sur les méthodes par dilution simple sans indicateur. L'hémolyse est en général un phénomène assez net qui permet d'apprécier plus facilement la dernière dilution ou la croissance du germe test est nettement inhibée. Il nous semble cependant que cette hémolyse est un phénomène sujet à des irrégularités que l'on ne rencontre pas dans les méthodes utilisant un indicateur de pH.

Cependant, les méthodes de Fleming, surtout les « Slide Cells » sont susceptibles de donner entre les mains d'un expérimentateur entraîné des résultats nettement suffisants en clinique. Le fait de n'avoir à recueillir que quelques gouttes de sang à l'oreille, permet de répéter cette opération sans ennui notable pour le malade, ce qui est d'un intérêt primordial quand il est nécessaire comme nous le verrons plus loin, de ne pas se contenter d'un chiffre, mais de faire une courbe d'élimination.

Méthode par inhibition du pouvoir réducteur de W. Perfringens sur le Vert-Janus de A. R. Prévot

A. R. Prevot a mis au point une méthode extrêmement nouvelle et très rapide — le temps du dosage étant d'environ une heure — en mesurant le pouvoir inhibiteur de la Pénicilline sur la réduction du Vert-Janus, par *W. Perfringens.*

Technique : « Un litre de bouillon VF, glucosé à 2 % de pH 7,4 est additionné de 2,5 cc. d'une solution de Vert-Janus à 1 % et réparti en tubes de Hall, sans bille, de façon que le niveau supérieur du milieu atteigne exactement l'étranglement, ce qui représente environ 7 cc. ; on stérilise trente minutes à 110°. Le Vert-Janus, au cours de cette stérilisation vire au mauve violacé. Les tubes stockés doivent subir une ébullition de trente minutes avant l'emploi, pour provoquer l'état d'anaérobiose, puis être refroidis aux environs de 37° avant de recevoir des doses croissantes des jus de Pénicilline à titrer. Un témoin ne reçoit pas de Pénicilline.

Souche : On utilise la souche H.A. qui pousse en une heure environ, réduit le Vert-Janus dans le même temps et dont 0,1 cc. ensemencé en tube de Hall est inhibé par 0,50 U.O. La souche est préalablement repiquée sur bouillon VF glucosé en tube de Hall et il faut utiliser une culture très jeune (deux heures) en pleine fermentation.

Titrage : On répartit très exactement d'abord les dilutions de Pénicilline et aussitôt après 0,1 cc. de cette culture dans tous les tubes, y compris le témoin. Cette répartition doit être extrêmement exacte sous peine de rendre le titrage illisible et exige une petite manœuvre préparatoire : Les cultures jeunes de *W. Perfringens* dégagent énormément de gaz naissant. Il faut stopper pendant quelques minutes ce dégagement qui, s'il se produi-

sait dans la pipette graduée, rendrait toute précision illusoire ; il est donc nécessaire de transvaser stérilement la souche de titrage de la pipette à boule dans un nouveau tube stérile. Ce simple transvasement provoque l'éclatement des bulles de gaz naissant et permet un pipetage exact.

Après la répartition des doses de Pénicilline et de *W. Perfringens,* il est absolument nécessaire de bien homogénéiser le mélange, car en général, la Pénicilline reste en surface et la suspension microbienne tombe au fond, ce qui provoquerait des irrégularités. Cette homogénéisation se fait au mieux en imprimant au tube tenu debout un mouvement rapide de rotation dans un plan vertical qui amène un brassage parfait du mélange.

On place au bain-marie à 37°, de préférence à l'étuve, ce qui accélère le titrage. Dès que le témoin pousse (environ une heure), il se décolore. En même temps, se décolorent tous les tubes où la Pénicilline n'a pas inhibé la croissance du Perfringens. Le premier tube non décoloré indique la dose minima inhibant 0,1 cc. de Perfringens équivalant à 0,50 U.O. Cette méthode est non seulement rapide mais sensible, puisque une différence de 0,1 cc. d'une solution contenant de la Pénicilline amène la décoloration ou la non-décoloration ».

La même méthode peut, comme les précédentes, être employée pour mesurer la sensibilité d'un germe isolé d'un malade. Toujours d'après A. R. Prevot : « Le même principe d'action inhibitrice de la Pénicilline sur la décoloration des indicateurs de Rh par les bactéries réductrices permet d'apprécier en un temps très court si le malade est justiciable de la Pénicillothérapie. Il suffit de remplacer la suspension de Perfringens par une suspension du matériel infectieux à examiner et les dilutions inconnues de Pénicilline par des doses croissantes connues de Pénicilline titrée. Il est bon de faire des bornes espacées : 100 U.O., 50, 10, 5, 1. En quelques heures, si

le matériel infectieux est pénicillo-résistant, tous les tubes sont décolorés et cela en même temps que le témoin. Si le matériel infectieux est pénicillo-sensible, les concentrations faibles (1 U.O., 5 U.O.) sont décolorées avec retard sur le témoin, mais les concentrations fortes (10, 20, 50, 100 U.O.) restent colorées ».

Cependant, diverses modifications à cette méthode ont dû être apportées. Elles sont relatées dans un article plus récent de A. R. Prevot, M. Peyré et M. Digeon : « La méthode au Vert-Janus a été employée au centre de titrage de la Pénicilline de l'Institut Pasteur pendant cinq mois, avec la souche HA de *Welchia Perfringens,* sans difficultés ni irrégularités. Après ce délai, brusquement sont apparues des irrégularités dans l'étalonnage, des incubations de plus en plus longues, des interprétations impossibles par suite de l'existence de tubes abhérents dans les séries.

On observant la souche de titrage, nous avons observé l'apparition d'une mutation se manifestant surtout par des colonies irrégulières en gélose profonde. Les repiquages de colonies irrégulières donnent environ 50 % des deux formes ; le repiquage des colonies lenticulaires donne la même proportion des deux formes. C'est une mutation irréversible et nous n'avons pas pu retrouver la forme normale permettant les titrages rapides et réguliers. Nous avons d'abord cherché à remplacer cette souche par une autre souche de la même espèce. Mais les quarante-neuf souches de Perfringens de notre collection n'ont pas présenté la sensibilité indispensable à un titrage précis. Elles se sont étalonnées entre 4 et 20 U.O. alors que la souche HA était stable à 0,50 U.O. Nous avons dû essayer d'autres espèces. Parmi les nombreuses espèces essayées, nous en avons retenu deux : *Cl. Septicum* s'étalonnant en général à 0,50, et *Cl. Butyricum*, en général à 0,40. Le premier ne permet qu'un titrage semi-rapide (5-6 heures), le deuxième au contraire permet un titrage

presque aussi rapide qu'avec *W. Perfringens* : deux à trois heures ».

Ayant ainsi modifié le titrage, les auteurs calculent les erreurs relatives ; la moyenne en a été de 8,5 %. Et ils concluent en ces termes : « Elle est donc de l'ordre des erreurs rencontrées habituellement dans les titrages biologiques. Elle semble moins élevée que dans la méthode d'Oxford ce qui tient à notre avis à trois causes : Remplacement de l'ensemencement par gouttes par 0,1 cc. mesuré à la pipette de précision, emploi de cultures homogénéisées par brassage, enfin lecture facilitée par la décoloration de l'indicateur ».

CHAPITRE II

TITRAGE BIOLOGIQUE DE LA PENICILLINE DANS LE SANG ET LE LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN PAR LA METHODE DE B. SUREAU, F. DEPIN ET O. SCHURR

Les dosages Oxford ou Heatley utilisés depuis 1943 répondaient à un but bien précis : titrer soit des jus de culture de Pénicillium, soit des échantillons de Pénicilline au cours de la fabrication industrielle. Tous ces liquides avaient la double caractéristique au point de vue du dosage d'être de titre élevé et en grande quantité, d'où la possibilité de les diluer. D'autre part, on sait que de très infimes modifications des constituants ou du pH des appareils, sont susceptibles d'influer considérablement sur la production. Une méthode rapide, comme celle de A. R. Prevot au Vert-Janus était très utile pour y porter rapidement remède. Mais toutes ces méthodes étaient difficilement transposables en clinique pour différentes raisons que nous avons exposées : insuffisance de quantité du produit à titrer, taux faible qui fait rejeter notamment toutes les méthodes qui ne peuvent titrer moins de 0,20 U.O., soit parce qu'elles ne sont plus lisibles, soit parce que le germe employé a son taux de sensibilité à ce ni-

veau et qu'*une méthode ne peut titrer moins que le taux d'inhibition du germe test*, enfin, à cause des difficultés techniques. En effet, la plupart des méthodes semblent n'avoir été utilisées que dans des laboratoires spécialisés capables d'apporter un soin particulier à leur standardisation et de diminuer ainsi le pourcentage des erreurs.

Dans les liquides organiques : Sang, liquide céphalo-rachidien, exsudat, etc., le problème est tout autre. Il s'agit de titrer des quantités de Pénicilline de 0 à 1 U.O. avec une précision d'importance variable. Celle-ci doit atteindre 0,02-0,04 U.O. dans la première tranche entre 0 et 0,15 U.O., au dessus les écarts pourraient être de 0,10 U.O. sans très grande importance, car on est alors au-dessus du taux de sensibilité de la grande majorité des germes susceptibles d'être atteints par la pénicillothérapie. Ce dosage doit aussi s'effectuer avec des quantités de liquide n'excédant pas 3 cc. pour être commode. Enfin, si l'on veut avoir une méthode vraiment clinique, il faut que son matériel, sa rapidité et sa facilité d'exécution soient analogues aux épreuves habituelles de laboratoire.

Nous avons essayé plusieurs méthodes, notamment celle des « Slide Cells » de Fleming, elle est excellente, mais d'une préparation assez difficile, les méthodes d'hémolyse nous ont donné des irrégularités gênantes, aussi celle qui nous a semblé répondre le mieux à tous les critères d'un dosage clinique est la méthode de *titrage en présence d'un indicateur de pH* de B. Sureau, F. Depin et O. Schurr. Nous l'avons employé et fait pratiquer avec des résultats excellents par les laborantines des Services Hospitaliers que nous remercions ici de l'aide qu'elles ont bien voulu nous apporter.

Principe

Cette technique est une méthode de dilution consistant comme celles-ci à ensemencer avec un germe standard dont on cherche à inhiber la pousse, une série de tubes de

milieu de culture contenant des concentrations décroissantes de la Pénicilline à titrer. Le chiffre de la dernière dilution inhibée comparé à celui obtenu avec une gamme identique établie avec une pénicilline de titre connu, permet d'établir le taux en unités Oxford. Dans ce dosage, on utilise pour rendre le résultat plus lisible, l'addition d'un sucre et d'un indicateur de pH. Si le staphylocoque se développe, le sucre est fermenté et l'indicateur vire. Le sucre utilisé dans la méthode de B. Sureau est le glucose et l'indicateur : la Phénol-Sulfone-Phtaléine.

Technique

Les dilutions du milieu à titrer sont faites en gouttes dans de l'eau physiologique. A cette première dilution on ajoute une quantité égale de gouttes dans chaque tube d'un milieu contenant :

Phénol - sulfone - Phtaléine 15 %	X gouttes
Glucose à 30 %	XX gouttes
Eau peptonée	7 cc.

Ce milieu est *ensemencé au préalable* avec VII à X gouttes d'une dilution au 1/100^{me} d'une culture de 24 heures de staphylocoque standard.

I. — *Matériel*

Tubes à hémolyse

Nous avons utilisé des tubes de 7 centimètres de long et de 10 millimètres de diamètre intérieur. Leur taille n'est pas indifférente ; en effet, le volume total de liquide étant de XV gouttes, il faut que la hauteur de la colonne de liquide soit assez haute pour avoir une bonne lecture, mais il faut de plus que le diamètre soit assez large pour permettre une agitation complète des milieux en présence. Ces tubes sont soigneusement bouchés et stérilisés. Leur manipulation et leur remplissage suivant la technique bactériologique ordinaire entraîne une grosse perte de temps et des grandes possibilités d'erreurs dans

la mise en place des gouttes, aussi nous avons essayé de vérifier si le pourcentage des souillures éventuelles justifiait l'emploi de cette technique. Nous avons opéré en stérilisant les tubes bouchés dans de grandes boîtes, puis les bouchons étaient enlevés avec une pince flambée quand on répartissait les tubes sur les porte-tubes et mis dans de grandes boîtes de Petri stériles. Ils étaient remis ensuite avec la pince flambée dès que la répartition des gouttes était faite, avant d'agiter. Ce procédé peut sembler incorrect, aussi, nous avons contrôlé après culture, le contenu des tubes. Sur trois cents contrôles effectués, nous n'avons trouvé qu'une fois un bacille gram positif dont la présence n'avait pas troublé le résultat et qui possédait un index de sensibilité voisin du staphylocoque standard. Ce procédé réduisant des trois quarts le temps du dosage, nous avons cru être autorisé à l'utiliser, quitte à contrôler tous les tubes nous semblant douteux.

Pipettes

La même pipette Pasteur de diamètre assez gros doit servir pour effectuer un dosage, le volume des gouttes devant être naturellement le même.

Milieu

Il est important que le même milieu soit utilisé pour que les résultats soient constants et comparables. Le mieux est d'avoir une eau peptonée de composition nettement définie, facile à reproduire. Son pH doit être de 8,2-8,4. Les solutions de glucose à 30 % et de Phénol-Sulfone-Phtaléine à 15 % doivent être réparties en ampoules de 2 cc. et stérilisées.

On a avantage à préparer une quantité importante de tubes avec le mélange eau peptonée-glucose-P.S.P., à vérifier leur stérilité après séjour à l'étuve et à les stocker.

Souche de staphylocoque étalon

Nous nous sommes servi successivement de deux souches de staphylocoque Londres venant de l'Institut Pasteur. Ces deux souches avaient la même sensibilité à la Péni-

cilline qui était d'environ 0,025 U.O.. C'est-à-dire que 0,025 U.O. par cc. inhibait leur croissance. L'entretien s'est fait suivant la technique indiquée par R. Martin, F. Nitti, B. Sureau et J. Berrod en partant d'une culture sur gélose dont on fait deux repiquages successifs en bouillon à vingt-quatre heures d'intervalle.

La seconde culture en bouillon servant à faire la dilution au 1/1.000me en eau physiologique qui sert à ensemencer le milieu. Cependant, il existe de nombreuses variations de pousse d'une culture de vingt-quatre heures, aussi cette dilution au 1/100me doit être corrigée jusqu'à une opacité standard que l'on peut établir au photomètre ou beaucoup plus simplement à l'œil.

L'ensemencement est fait avec X gouttes de cette dilution pour 10 cc. de milieu.

Pénicilline servant pour la gamme étalon

Nous nous sommes servi de Pénicillines utilisées pour le traitement dans les salles, de marques diverses, titrant 10.000 U.O. par cc. Les dilutions nécessaires pour amener la Pénicilline au titre de 1/10me d'U.O. par cc. se faisant en eau physiologique stérile, dans des tubes et avec des pipettes précises stériles. Cette dilution doit être faite au moment du dosage, les dilutions faibles de Pénicilline ne se conservant pas d'un jour à l'autre.

Liquides organiques à titrer

Il faut environ 2 cc. de liquide pour effectuer un dosage. Le sang doit être recueilli en tube stérile et centrifugé après coagulation. Le sérum recueilli, conservé à la glacière à 4°, conserve sa Pénicilline quarante-huit heures environ ; au-delà on note une baisse notable du taux. Cependant cette baisse dans les liquides organiques est beaucoup plus faible que dans les dilutions aqueuses. Un L.C.R. dosé huit jours après la ponction avait encore une dose notable.

Comme dans tous les dosages par dilution, il n'est pas possible de titrer directement les liquides souillés. Il est possible de filtrer sur filtre Seitz. Cependant, d'après certains auteurs, une quantité importante de Pénicilline reste collée sur le filtre, dont il faudra tenir compte. Il faudra tenir compte aussi du fait que dans les urines, le B. Coli secrète souvent une pénicillinase susceptible d'abaisser les taux ou de les annuler, au contraire dans les pus de plaies infectées, le B. Pyocyanique peut produire de la Pyocyanine et majorer les résultats.

II. — *Temps du dosage*

Premier temps : gamme étalon :

N° des tubes	1	2	3	4	5	6
Eau physiologique ...	III	IV	V	VI	VII	VIII
Pén. 1/10 U.O. cc. ...	VII	VI	V	IV	III	II
Milieu glucose P.S.P. ensemencé.	V	V	V	V	V	V
	1	1	1	1	1	1
Titre final	20	25	30	37	50	75

Si le staphylocoque avait la sensibilité donnée dans la définition de l'Unité Oxford et si la Pénicilline employée était de titre rigoureusement exact, l'inhibition devrait encore avoir lieu pour 1/50^{me}.

Mais nous avons vu que notre souche était un peu moins sensible, son taux d'inhibition étant de 1/40^{me} environ. Nous avons habituellement après dix-huit heures d'étuve : quatre tubes rouges où la P.S.P. n'a pas viré, et deux tubes jaunes où la croissance s'est faite, le glucose a été fermenté et la P.S.P. virée.

Deuxième temps : titrage du liquide.

(*Voir le tableau ci-contre*)

Il importe d'effectuer les dilutions dans l'ordre indiqué, eau-sérum-milieu. Les dilutions de sérum au 1/5 et au 1/25 se font en diluant à part dans un tube à hémolyse stérile :

Deuxième temps : Titrage du liquide

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Eau phys.	III	V	VI	VII	VIII	III	V	VI	VII	VIII	III	V	VI	VII	VIII
Sérum à titrer															
S. pur	VII	V	IV	III	II										
S. dilué 1/5						VII	V	IV	III	II					
S. dilué 1/25											VII	V	IV	III	II
Milieu glucose-PSP ensemencé.	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	7	1	4	1	2	7	1	4	1	2	7	1	4	1	2
Titre final	15	3	15	5	15	75	15	75	25	75	375	75	375	125	375

1/5 : 6 gouttes de sérum dans 24 gouttes d'eau phys.

1/25 : 1 goutte de sérum dans 24 gouttes d'eau phys.

On ne prépare qu'une portion de cette gamme suivant la teneur présumée. Pour le sang, les dix premiers tubes suffisent en général.

Les tubes bouchés sont agités énergiquement pendant une minute au moins soit à la main, soit avec un agitateur de Kahn.

On porte à l'étuve à 37° et on lit les résultats après dix-huit heures.

III. — *Résultats*

On observe qu'un certain nombre de tubes sont virés au jaune, d'autres sont restés rouges. Il y a souvent 1-2 tubes de teinte intermédiaire orangée où la fermentation n'a pas été totale. On doit les considérer comme virés. En effet, dès que l'indicateur commence à virer, c'est qu'une certaine pousse s'est effectuée. C'est justement cette zone difficile à évaluer à l'œil dans la méthode de dilutions que la présence d'un indicateur de pH met nettement en évidence ici.

La teneur en Pénicilline du milieu à titrer est obtenue de la façon suivante : *On multiplie la première dilution virée de l'étalon par l'inverse de la première dilution virée du sérum à titrer. Puis la dernière dilution non virée de l'étalon par l'inverse de la dernière dilution non virée du milieu à titrer.* On prend la moyenne entre les deux chiffres obtenus.

Il est intéressant de connaître la gamme des chiffres possibles.

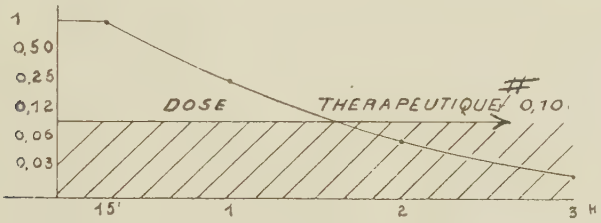
Par exemple si l'étalon vire à la dilution de 1/50 les chiffres peuvent être :

0,04 — 0,06 — 0,07 — 0,10 — 0,15 — 0,20 — 0,30 — 0,37
0,50 — 0,75 — 1,00 — 1,50 — 1,87 — 2,40 — 3,75 U.O.

Pour virage de l'étalon à 1/37 on a :
0,05 — 0,08 — 0,10 — 0,13 — 0,20 — 0,20 — 0,40 — 0,50
0,67 — 1,00 — 1,44 — 2,00 — 2,50 — 3,33 — 5,00 U.O.

Ces chiffres donnés à titre d'exemple montrent que la gamme possible est très resserrée entre 0 et 0,20 U.O. et l'écart croît considérablement au-dessus avec ce tableau de dilutions.

Or, justement l'examen d'une courbe d'élimination d'une injection intramusculaire montre que la précision est beaucoup moins importante dans le clocher obtenu



un quart d'heure après l'injection où l'on a alors une dose nettement thérapeutique. Par contre, les taux obtenus une heure et trois heures après, qui sont au voisinage de cette dose thérapeutique, ont besoin de beaucoup plus de précision.

Différents facteurs influant sur le titrage

Temps d'étuve : Celui-ci a une importance certaine. Voici la variation particulièrement typique d'une gamme étalon avec le temps :

Temps :	12 h.	18 h.	26 h.	72 h.	8 jours
Dernière dilution non virée.	1 50	1 37	1 30	1 20	8 0

Au dessus de 18 heures, la fermentation est souvent faible dans certains tubes et des variations minimes de la

P.S.P. sont difficiles à apprécier. Au-delà de dix-huit heures, le titre baisse et au bout de huit jours tous les tubes finissent par pousser. Cette variation étant parallèle dans la gamme du liquide à titrer et le calcul se faisant en comparant les deux, ce facteur influe peu sur le résultat lu entre douze et vingt-quatre heures.

Si l'on calcule les chiffres moyens sur vingt dosages par exemple, de deux pénicillines dont le titre théorique aurait dû être de 0,15 U.O. et 0,40 U.O. La variation avec le temps *du chiffre moyen* est faible :

	18 h.	24 h.
Pen. titrant approx. 0,15 U.O.....	0,14	0,14
Pen. titrant approx. 0,40 U.O.....	0,345	0,353

Par contre, si l'on étudie *le nombre et l'importance des écarts* on voit qu'ils varient beaucoup avec le temps.

On voit d'après ces deux diagrammes que les écarts extrêmes sont beaucoup plus importants après vingt-quatre heures d'étuve qu'après dix-huit heures. En opérant donc la lecture au bout de dix-huit heures, on se

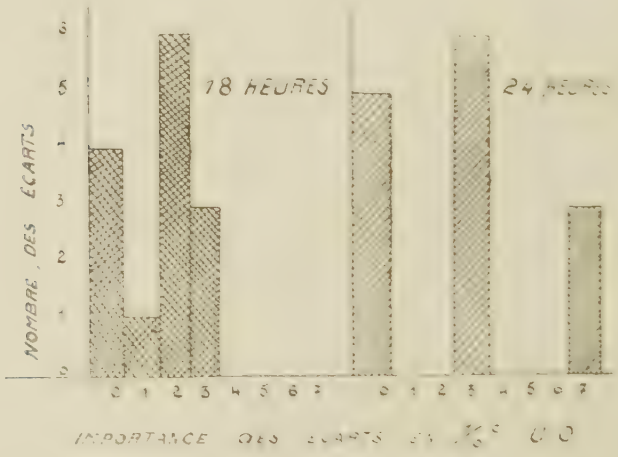


Figure 4 : Ecarts sur 14 dosages avec une Pénicilline titrant approximativement 0,15 U.O.

trouve dans les meilleures conditions, et nous verrons alors que les écarts n'excèdent pas 0,03-0,06.

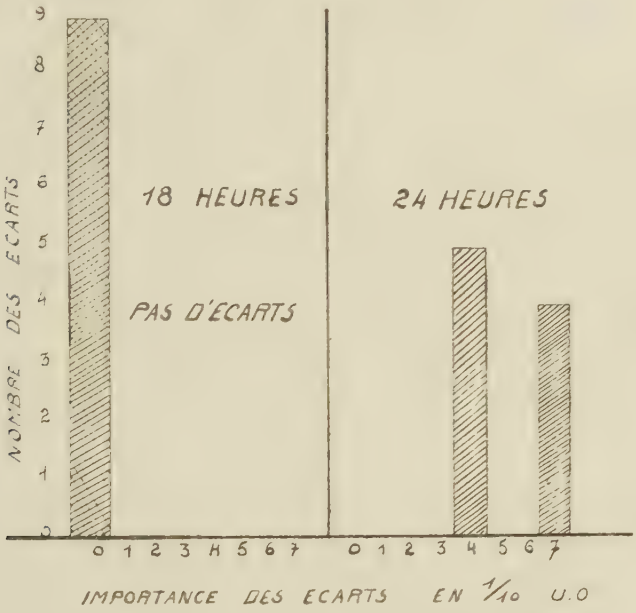


Figure 5 : Ecarts sur 9 dosages avec une Pénicilline titrant approximativement 0,40 U.O.

Age de la culture du germe test : Nous nous sommes tenus d'observer les règles énoncées dans la technique, le reproche essentiel fait à ces méthodes biologiques étant justement la variation de la souche. Cependant, il faut remarquer que la souche de staphylocoques H. d'Oxford est utilisée depuis quatre ans dans un grand nombre de laboratoires sans variations importantes pouvant nuire aux essais. Cowan étudie en 1945 sept souches de staphylocoques H d'Oxford, venant de laboratoires différents. Celles qui avaient été repiquées journellement avaient acquis une hypersensibilité. Par contre, la souche de Garrod conservée sur gélose, avait gardé une sensibilité normale. Donc, la précaution de repartir d'une gélose suivant la méthode de R. Martin est excellente pour lui conserver sa valeur.

Nous avons étudié les chiffres obtenus avec des cultures d'âges différents :

	24 h.	3 jours	3 mois	6 mois
Pen. titr. approx. 0,20 U.O.	0,21	0,18	0,24	0,24

Cet essai n'aurait de valeur, le calcul se faisant en comparant la gamme du liquide de titre inconnu avec la gamme étalon, que s'il y avait des variations très importantes.

pH du milieu : Le pH du milieu utilisé est de 8,4-8,2. Ce pH est nécessaire pour que la P.S.P. soit franchement rouge.

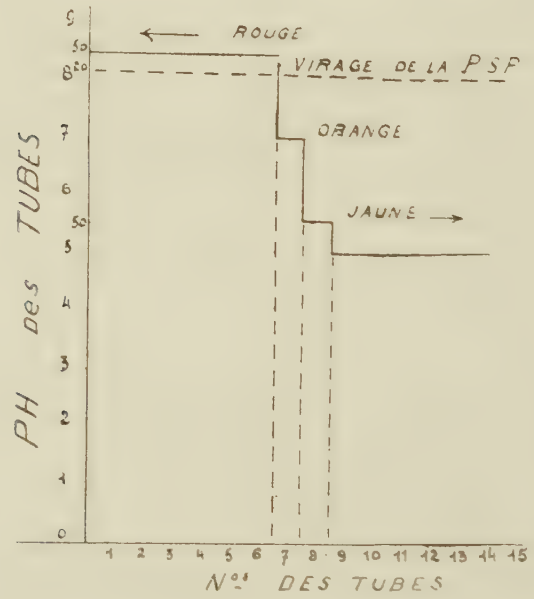


Figure 6 : Variation du pH au cours d'un titrage

Ce pH a intérêt à être fixe, les chiffres obtenus en bouillon de pH 7,5 avec d'autres indicateurs, comme le tournesol, le bleu de bromothymol, ou la phénaphtazine nous ont donné des chiffres un peu plus élevés.

Liquide de dilution : Dans le tableau que nous avons indiqué pour titrer du sérum sanguin, le taux du milieu sur le volume total est du tiers. Pour titrer par exemple des Pénicillines commerciales et que l'on veuille sérier encore plus les dilutions en gouttes, on est souvent obligé de faire tomber ce taux au quart. Les résultats deviennent alors moins nets et la gamme présente de nombreux tubes abhérents qui rendent son interprétation difficile.

On peut obvier à cet inconvénient en remplaçant l'eau physiologique par un liquide nutritif. Nous avons fait plusieurs essais avec du bouillon, de l'eau peptonée, du sérum, de l'ascite, du liquide d'exsudat stérile. La méthode devient alors d'autant plus nette que le milieu est plus riche, notamment le virage est plus brutal sans tube orangé intermédiaire.

C'est pour cette raison que la gamme située entre 0 U.O. et 0,20 U.O. est plus nette que la partie située au-dessus. Il ne semble cependant pas qu'il faille utiliser ce remplacement, la présence du sérum apportant un élément de trouble que nous allons étudier.

Sérum a titrer : La présence du sérum à titrer, en quantités importantes et variables, dans les dilutions inférieures ou égales à 0,15 U.O. peut amener deux ordres de phénomènes :

L'inactivation de la Pénicilline par le sérum qui a été étudié par Bigger en 1944. Les expériences de cet auteur montrent une action inactivatrice nette débutant surtout après quarante-huit heures de contact et presque uniquement à une température de 37° ; à 0°, cette action étant très faible. Nous avons essayé de vérifier ces faits en nous plaçant dans les conditions habituelles du dosage, c'est-à-dire vingt-quatre heures de contact à la glacière.

Sur 17 dosages :

14 n'avaient aucun pouvoir abaissant
1 avait un pouvoir de 40 %

1 avait un pouvoir de 20 %
1 avait un pouvoir de 10 %

Pour ce dosage, cette inactivation ne joue donc que très peu si l'on a soin de conserver le sérum à la glacière et d'effectuer le titrage moins de quarante-huit heures après la prise.

Le pouvoir inhibiteur du sérum humain est beaucoup plus important. Chandler, Price et Randall l'étudièrent avec précision, employant une méthode de dilution avec le B. Subtilis comme organisme-test. Ils le recherchèrent à la fois chez des sujets sains, des malades avant pénicillothérapie et des malades en traitement en neutralisant exactement les concentrations de Pénicilline avec de la Clarase ou de la Pénicillinase. Sur 211 sérums examinés, 85, soit 40 % avaient un pouvoir inhibiteur naturel. Sur ceux-ci 65 avaient une action dilués au 1/4
15 avaient une action dilués au 1/8
5 avaient une action dilués au 1/16
1 avait une action dilué au 1/32

Il serait donc en principe utile de titrer ce pouvoir chaque fois qu'on le peut avant de mettre le malade en traitement ou pendant un intervalle où il ne reçoit pas de Pénicilline. Bien que ce pouvoir soit susceptible de varier dans des proportions importantes au cours de l'évolution, on pourrait ainsi avoir une idée des corrections à apporter aux chiffres ultérieurs.

Présence de glucose : Lochead et Timonin rapportent que 1 % de glucose dans le milieu serait susceptible d'augmenter cent fois le pouvoir bactériostatique de la Pénicilline. Nous avons fait dix essais en comparant les chiffres obtenus avec un milieu glucose-P.S.P. et avec un milieu sans glucose où la pousse était observée directement, nous n'avons pu trouver des différences supérieures aux variations habituelles de la méthode.

Etude de la précision

Malgré tous les facteurs que nous venons de décrire, ce dosage est très facile à standardiser et surtout la *comparaison entre la gamme étalon et la gamme du liquide à titrer* réduit considérablement leur action et la marge d'erreurs.

Le reproche essentiel fait justement aux méthodes de titrage biologique est leur imprécision. Que veut-on dire par là ?

La précision maximum sera toujours demandée quand il s'agira de titrer une Pénicilline commerciale ou un jus d'étude, mais en est-il de même quand il s'agit en clinique de titrer un antibiotique dans un liquide organique ?

Dans le sang par exemple, deux tranches peuvent être nettement dissociées : la première s'étend de 0 à 0,20 U.O. et la seconde entre 0,20 et 2 U.O. Cette dernière correspond à des chiffres nettement thérapeutiques pour la majorité des germes sensibles à la Pénicilline. Il n'est, du reste, possible d'obtenir ces taux d'une manière permanente qu'avec les perfusions intraveineuses et seulement d'une manière transitoire avec les injections intramusculaires toutes les trois heures. Dans cette portion, on ne pourrait tirer d'écarts de 0,10 U.O. aucune déduction clinique. Par contre, dans la première zone, entre 0 et 0,20 U.O. on se trouve dans les limites de la sensibilité du germe à la Pénicilline. Il est théoriquement intéressant de lui appliquer au moins cette dose thérapeutique. Théoriquement, car on ne tient pas compte des repaires anatomiques où le germe peut se trouver et dont on ne connaîtra jamais la concentration en antibiotique. Cette sensibilité du germe étant toujours déterminée par une méthode biologique basée sur son inhibition à une concentration qui donnera son taux de sensibilité, on s'adresse à une méthode qui a elle-même une marge d'erreur de

20-25 %. Le taux de la Pénicillinémie ne sera utile à connaître qu'à 0,02-0,03 U.O. près. Cette précision est nettement obtenue avec la méthode que nous venons de décrire.

Tableau des écarts obtenus dans la méthode de B. Sureau pour deux solutions de Pénicilline titrant approximativement 0,15 U.O. et 0,40 U.O. :

0,15 U.O.			0,40 U.O.		
Chiff. obt.	écarts		Chif. obt.	écarts	
U.O.	U.O.	%	U.O.	U.O.	%
0,12	0,02	15 %	0,42	0,06	16 %
0,12	0,02	15 %	0,30	0,06	16 %
0,12	0,02	15 %	0,42	0,06	16 %
0,17	0,03	21 %	0,42	0,06	16 %
0,12	0,02	15 %	0,30	0,06	16 %
0,17	0,03	21 %	0,30	0,06	16 %
0,17	0,03	21 %	0,35	0,01	3 %
0,15	0,01	7 %	0,30	0,06	16 %
0,12	0,02	15 %	0,42	0,06	16 %
0,12	0,02	15 %	0,35	0,01	3 %
0,12	0,02	15 %	0,35	0,01	3 %
0,15	0,01	7 %	0,35	0,01	3 %
0,17	0,03	21 %	0,30	0,06	16 %
0,17	0,03	21 %	0,42	0,06	16 %
0,12	0,02	15 %	0,42	0,06	16 %
Moyenne :					
0,14	0,022	16 %	0,36	0,046	12 %

CHAPITRE III

LA METHODE GLUCOSE-P.S.P. DANS LE TITRAGE DES ÉCHANTILLONS ET DILUTIONS UTILISÉES EN THÉRAPEUTIQUE

Dans les laboratoires de contrôle de fabrication ou de recherche, les méthodes utilisées sont soit la méthode Oxford, soit la méthode des cylindres de Heatley, souvent avec le *B. Subtilis* comme organisme-test. Mais, dans un laboratoire de clinique, les différents cas qui se posent sont légèrement différents. Il y a d'abord un contrôle nécessaire à effectuer sur les envois de Pénicilline qui parviennent après un temps assez long. Notamment en été, plusieurs envois sont restés en souffrance dans des conditions de température très éloignées des conditions normales de conservation. D'autre part, avec la vulgarisation du produit, des cliniciens demandent à employer de très nombreux échantillons souvent périmés. Un titrage très précis de leur activité serait souhaitable, mais un titrage à 1.000 U.O. près pour des Pénicillines commerciales titrant en principe 10.000 U.O. par cc. est nettement suffisant pour l'utilisation thérapeutique. Nous avons titré ainsi différents échantillons en employant parallèlement un dosage par la méthode Oxford et un dosage par la méthode glucose-P.S.P. de B. Sureau.

Pour réaliser ce dernier dosage, il est nécessaire de modifier le tableau donné dans le chapitre précédent, de façon à obtenir des chiffres à intervalles fixes et non variables comme dans le titrage des liquides organiques.

Nous avons employé le tableau suivant :

No des tubes ...	5	6	7	8	9	10
Eau phys.				II	IV	VI
Pén. à titrer						
1/10 U.O. cc.	IV	IV	IV	IV	IV	IV
Milieu	VI	VIII	X	X	X	X
Titre final.	1	1	1	1	1	1
	25	30	35	40	45	50

Le calcul se faisant après dix-huit heures d'étuve par rapport à une Pénicilline de titre connu.

Chiffres obtenus avec des échantillons d'origines diverses en U.O. par cc. :

P. Squibb	90-100.000	100-110.000
P. Merck (L. 1206)	9-10.000	9-10.000
P. Merck (L. 1206)	10-11.000	10-11.000
P. Merck (L. 1204)	9-9.000	9-10.000
P. Ayerst (960)	9-10.000	9-10.000
P. Ayerst (940)	9-10.000	10-11.000
P. Léderlé	10-11.000	10-11.000
P. Roche (périmée depuis déc. 1945. Conservée à 4°)	8-9.000	7-8.000
P.C.S.C. (périmée depuis déc. 1945. Conservée à 4°)	6-7.000	7-8.000
P. Merck (282) (conservée à temp. variable élevée)	4-5.000	4-5.000
	4-5.000	4-5.000
P. Squibb (10.000 U.O. cc. ayant voyagé à haute temp.)	6-7.000	5-6.000
Specilline G.	10-11.000	10-11.000

On voit que la méthode de B. Sureau, beaucoup plus rapide, donne des résultats comparables au dosage Oxford, parfaitement utilisables en clinique.

Si la conservation de la Pénicilline en poudre varie très lentement même avec des températures élevées, certains flacons, une fois dilués, risquent d'être conservés ensuite à des températures variables. Il nous a paru intéressant d'étudier avec la méthode glucose-P.S.P. cette conservation. Nous avons trouvé des chiffres parallèles à ceux publiés par Kirby en 1944.

Conservation à des températures variables de deux échantillons de Pénicilline :

1. P. Ayerst 960 titrant 10.000 U.O. cc.

Conservation	10 jours	15 j.	20 j.	30 j.
4°	8-9.000	7-8.000	7-8.000	6-7.000
15°	8-9.000	6-7.000	3-4.000	3-4.000
37°	2-3.000	2-3.000		

2. P. Squibb titrant 100.000 U.O. cc.

Conservation	10 jours	15 j.	20 j.	30 j.
4°	100-110.000	90-100.000	90-100.000	60-70.000
15°	90-100.000	80-90.000	60-70.000	60-70.000
37°	50-60.000	30-40.000	20-30.000	

En dehors de la voie intramusculaire ou intraveineuse, les injections locales utilisent des Pénicillines de taux très divers. Des solutions titrant 250 à 500 U.O. par cc. sont employées en pulvérisation ou en irrigation continue.

Conservation des dilutions à des températures variables:

Conservation		24 h.	48 h.
à 4°	Dilution à 1.000 U.O. cc.....	6-700	4-500
—	100 U.O. cc.....	5-60	2-30
—	10 U.O. cc.....	7-8	3-4
—	1 U.O. cc.....	0,40-0,50	—

à 15°	Dilution à 1.000 U.O. cc.....	8-900	4-500
—	100 U.O. cc.....	4-50	—
—	10 U.O. cc.....	3-4	—
—	1 U.O. cc.....	0,20-0,30	—
à 37°	Dilution à 1.000 U.O. cc.....	3-400	1-200
—	100 U.O. cc.....	20-30	—
—	10 U.O. cc.....	—	—
—	1 U.O. cc.....	—	—

Les dilutions ont été faites en eau physiologique et non en solution tamponnée.

Au cours de plusieurs essais de cette conservation, nous avons rarement rencontré des résultats comparables et les dilutions ont varié d'une manière capricieuse qui rend impossible son utilisation au-delà de 24 heures.

Conservation de la Pénicilline dans les appareils de perfusion intraveineuse

Il est un cas où une méthode simple de titrage peut renseigner utilement le clinicien, c'est le cas des perfusions intraveineuses. En effet, dans le flacon de perfusion, la Pénicilline se trouve sous une grande dilution de titre variable, allant de 100 à 1.000 U.O. par cc. ce qui donne une dose totale pour un litre de sérum de 100.000 à 1.000.000 d'U.O. Cette Pénicilline va se trouver à une température de 15-20° pendant douze heures et plus. Elle subira nécessairement une baisse due à la température, mais de plus le caoutchouc, et particulièrement le caoutchouc synthétique, est susceptible, d'après Cowan d'amener une baisse importante de cette activité. D'autant plus que l'instillation sera plus lente.

Dans un de nos essais portant sur 8-900.000 U.O. de Pénicilline diluée dans un litre de sérum physiologique, le taux de départ était de 800 U.O. par cc., 8 heures après de 500 U.O. et 12 heures après de 300 U.O.

Nous avons fait quelques essais de conservation d'une Pénicilline titrant 100 U.O. par cc. dans un tuyau de caoutchouc où elle est restée en contact vingt-quatre heures à 15° ; au bout de ce temps, elle ne titrait plus que 30-40 U.O. par cc., mais cet essai a été isolé et la chute n'excède pas de beaucoup celle de la Pénicilline conservée à même température dans un tube de verre. Il serait intéressant de reprendre ces essais en la conservant dans des solvants différents tels que le sérum physiologique, la Poly-Vinyl-Pyrrolydone, le Plasma sec, cette baisse étant susceptible d'influencer le résultat thérapeutique.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA PENICILLINEMIE SUIVANT DIVERSES VOIES PAR LA METHODE DE B. SUREAU

Notre but dans ce chapitre est de montrer que la méthode de B. Sureau que nous avons employée, s'applique parfaitement au titrage de la Pénicillinémie, les chiffres obtenus étant parallèles à ceux donnés dès le début de la Pénicillothérapie par les auteurs anglais et américains.

Nous étudierons les variations suivant les différentes voies d'introduction et les solvants utilisés. Mais surtout, nous nous attacherons à montrer *les variations individuelles considérables* pour une même voie et une même dose, nous réservant d'en tirer plus loin les conclusions cliniques.

Dès le début de ces dosages, il nous est apparu qu'un seul titrage se faisant même à une heure fixe après l'injection, ne renseignait que très mal sur l'élimination de la Pénicilline par le malade. Nous nous sommes efforcés dès lors de bâtir la courbe de cette élimination pour chaque malade entre deux injections qui, seule, donne une idée de l'intensité du traitement. Cependant, comme il s'agissait souvent de malades dont l'état général était assez mauvais, il ne nous a pas été possible comme dans beaucoup de travaux expérimentaux, de faire des dosages toutes les dix minutes, par exemple. Nous avons fait

faire en général, trois ou quatre prises de sang aux points les plus intéressants de la courbe, un quart d'heure, une heure, deux heures et trois heures après l'injection.

Voie intramusculaire

Cette élimination a été bien étudiée dès 1943 par Fleming d'abord avec la « Slide Cells Method », puis par Rammelkamp et Keefer avec leur méthode de dilutions sériées utilisant l'hémolyse comme indicateur. Nous reproduisons (fig. 7) la courbe classique de Fleming indiquant la variation de l'élimination avec la valeur de la dose injectée dans les muscles.

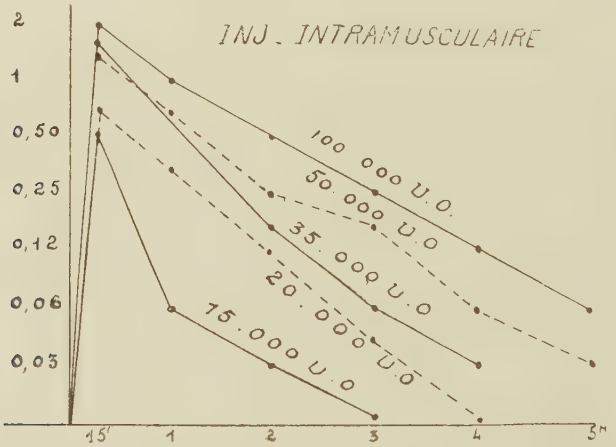


Figure 7 : Elimination avec des injections intramusculaires croissantes (Fleming).

Rammelkamp donne des chiffres légèrement inférieurs.

Nous allons donner maintenant les courbes que nous avons obtenues chez différents malades en cours de traitement. Pour la clarté de la lecture, nous avons utilisé une échelle identique à celle de Fleming, qui consiste à porter les concentrations en U.O. sur l'axe des ordonnées suivant une progression géométrique de raison 2. En effet, cette notation permet de détailler la partie la plus basse de la courbe qui est celle qui présente le plus d'intérêt.

A. — *Injections intramusculaires de* 100.000 *U.O. par injection*

Ces doses utilisées chez trois endocardites malignes nous ont donné les trois courbes que nous indiquons.

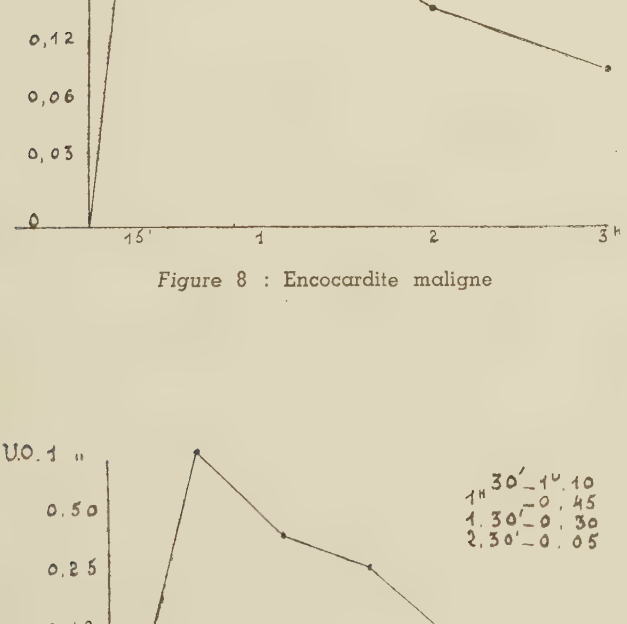


Figure 8 : Encocardite maligne

Figure 9 : Endocardite maligne

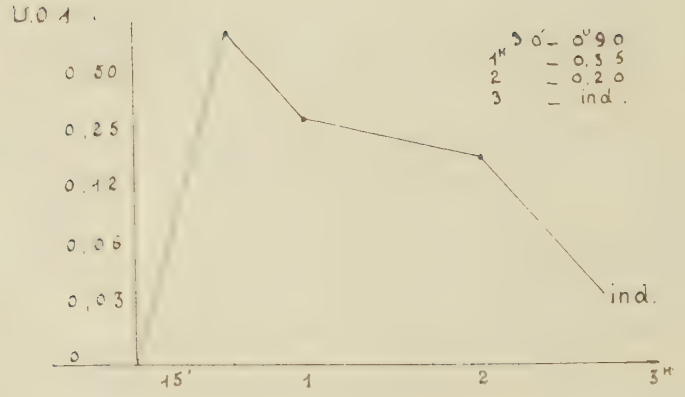


Figure 10 : Endocardite maligne

On voit que ces trois courbes sont nettement inférieures à celles données par Fleming, le taux est cependant élevé et pratiquement on peut dire que ces trois malades avaient un taux sanguin supérieur à 0,10 U.O. pendant deux heures ou deux heures trente. Traités par des millions d'Unités avant leur entrée à l'hôpital, ces malades présentaient tous une hémoculture négative. Il ne nous a donc pas été possible d'isoler le germe et de calculer son index de sensibilité. Cependant, se basant sur la sensibilité moyenne des streptocoques isolés dans l'endocardite, que des auteurs américains ont évalué à 0,12 U.O., on peut faire deux constatations : d'abord, pour obtenir dans ces cas, un taux de Pénicillinémie qui se maintient pendant deux heures trente à trois heures au dessus ou au voisinage du taux de sensibilité moyenne des germes pathogènes, il faut utiliser des doses qui sont de 800.000 à 1.000.000 U.O. par jour. Nous verrons plus loin que ce taux, qui peut être appelé dose thérapeutique, est loin d'être obtenu avec des doses journalières inférieures ; donc, la soi-disant inflation des doses utilisées dans les endocardites n'est qu'une mise au point clinique nécessaire. Les endocardites furent d'abord classées comme résistantes à la Pénicilline quand on utilisait 200.000 U.O.

par jour, actuellement avec un million, le pourcentage des succès croît, mais si l'on ne tient compte que de ces deux facteurs : sensibilité du germe et concentration sanguine des doses de 1.000.000 U.O. par jour ne sont pas encore susceptibles de maintenir un taux thérapeutique efficace que contre les streptocoques dont la sensibilité avoisine 0,10 U.O. Or, nous savons qu'il y en a de beaucoup plus résistants.

La seconde constatation est que s'il suffisait de détruire les streptocoques dans le sang circulant, le pourcentage des succès devrait être très grand ; il y a la grande question des repaires anatomiques, sur laquelle a insisté R. Martin, en l'espèce, les végétations valvulaires de l'endocarde. Ce sont ces repaires qui jouent le principal rôle dans les échecs de la pénicillothérapie.

B. — *Injections intramusculaires de* 40-50.000 *U.O. par injection*

Ces doses correspondent à un traitement journalier de 400.000 U.O. sont couramment employées en clinique actuellement, même pour des affections de gravité moyenne.

Pour vingt malades atteints d'infections diverses, nous avons établi leur courbe de Pénicillinémie.

Chez tous ces malades, dont l'état rénal était satisfaisant, nous avons trouvé des différences individuelles très importantes, qui nous ont permis de les classer en trois groupes suivant la durée de l'élimination.

1° *Elimination en trois heures*

Ce groupe reproduit des chiffres parallèles à ceux donnés par Fleming pour une injection de 50.000 U.O.

Il comprend six malades :

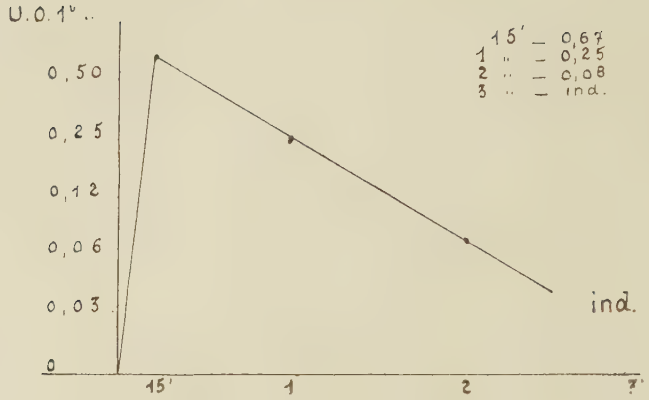


Figure 11 : Abcès du poumon

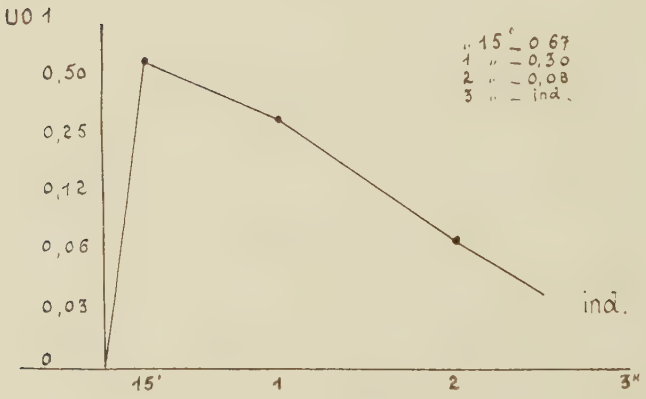


Figure 12 : Septicémie

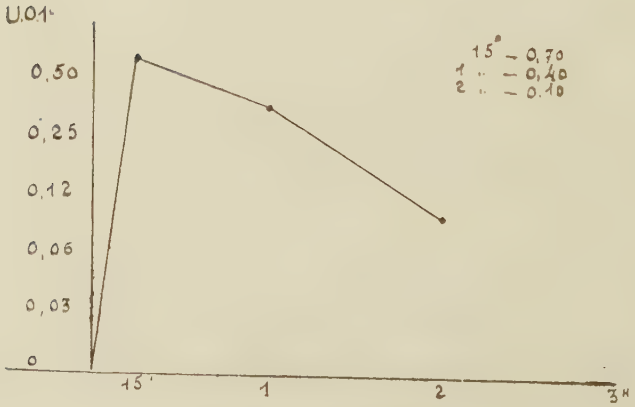


Figure 13 : Uréthrite

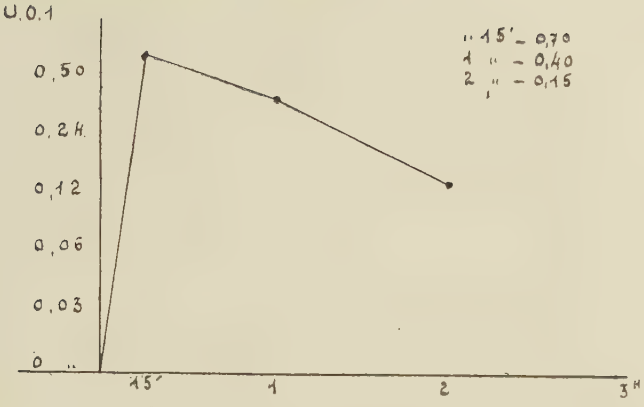


Figure 14 : Uréthrite

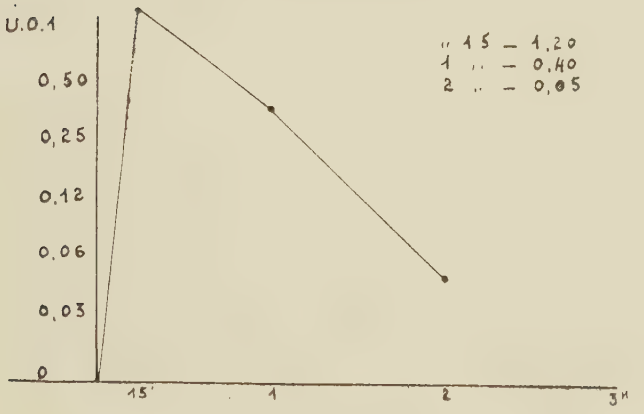


Figure 15 : Pneumopathie

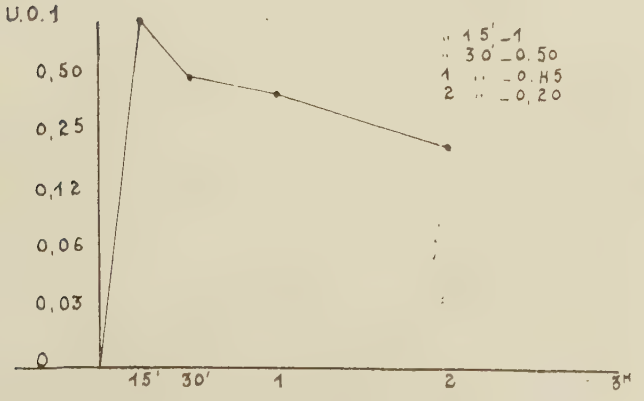


Figure 16 : Rhumatisme infectieux

Nous étions placés dans des conditions où le taux de la troisième heure juste avant l'injection suivante, était difficile à obtenir. Cependant, il est possible d'extrapoler et vraisemblablement dans les six cas que nous venons de donner, le taux était d'environ 0,03-0,06 à ce moment.

Si l'on admet, comme nous l'avons dit, que la majorité des germes sensibles à la Pénicilline sont inhibés par une concentration avoisinant 0,10 U.O., on voit, en dehors naturellement de toute question de terrain et de repaires anatomiques, que le traitement par injections de 40.000 U.O. toutes les trois heures était suffisant.

2° *Elimination en deux heures*

Ces chiffres sont déjà inférieurs à la courbe de Fleming. Ils portent sur six malades.

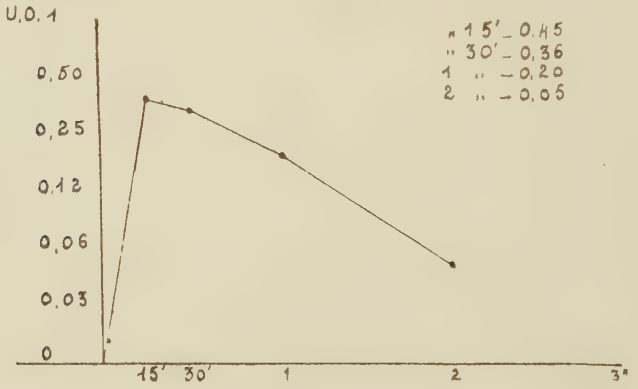


Figure 17 : Pleurésie purulente

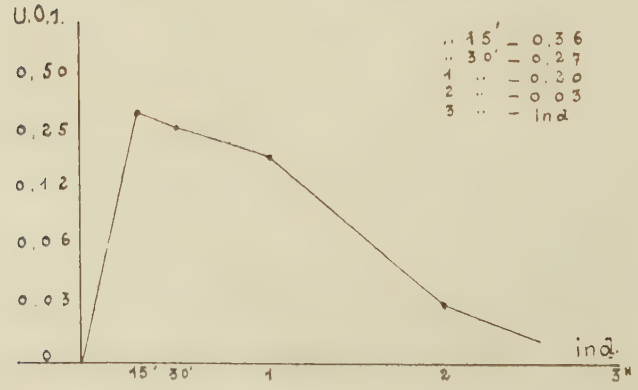


Figure 18 : Uréthrite

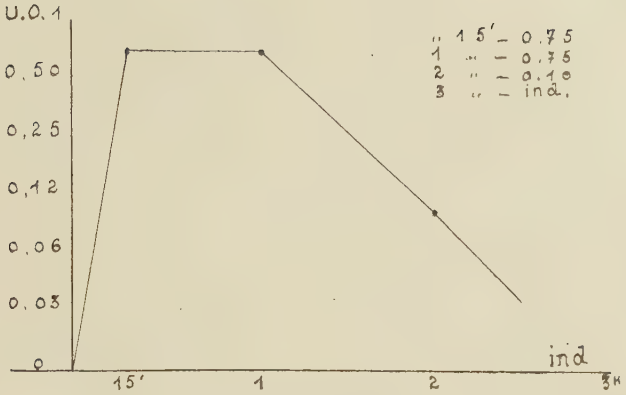


Figure 19 : Uréthrite sulfamido-résistante

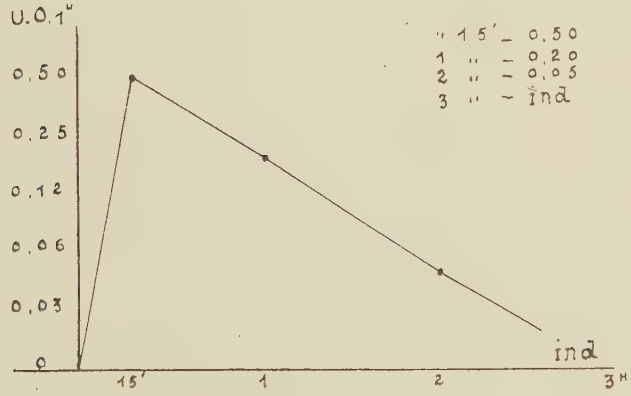


Figure 20 : Staphylococcie osseuse

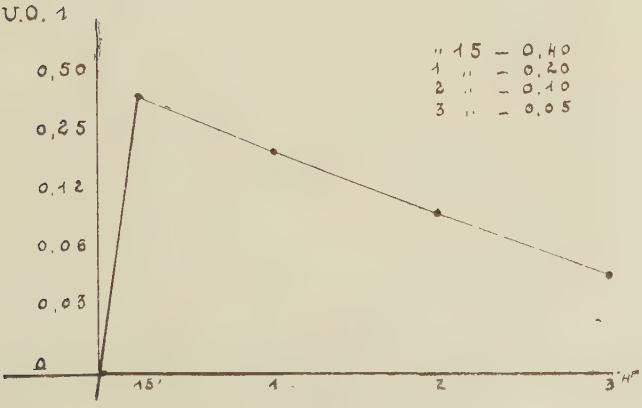


Figure 21 : Uréthrite aiguë

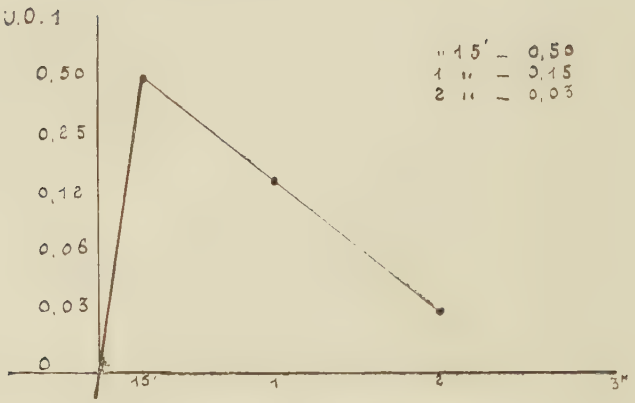


Figure 22 : Pneumonie

Ces six autres malades ont des chiffres bien inférieurs à ceux considérés comme normaux : En principe, ils auraient dû avoir 0,25 U.O. environ à la deuxième heure et 0,08 à 0,12, à la troisième heure. Ici, la moyenne des chiffres a été d'environ 0,05 U.O. à la deuxième heure et aucun n'a eu des chiffres dosables à la troisième heure. En effet, dans ces derniers chiffres, nous n'avons pas compté les tubes incomplètement virés semblant indiquer un très faible pouvoir bactériostatique du sérum, ne sachant s'il fallait le mettre sur le compte de la Pénicilline ou d'un pouvoir bactériostatique pré-existant dans le sérum, comme nous l'avons vu plus haut. Si l'on admet toujours le critère de 0,10 U.O. comme nécessaire à une action thérapeutique, on voit que ces malades ne le possédaient que pendant une heure trente.

Pendant un temps égal, le germe pouvait se trouver à une dose sous-thérapeutique et on est en droit de se demander si ces doses ne constituent pas un danger en entraînant la création de souches résistantes.

3° *Elimination en une heure trente*

Cette élimination extrêmement rapide constitue le groupe le plus important qui comprend huit malades.

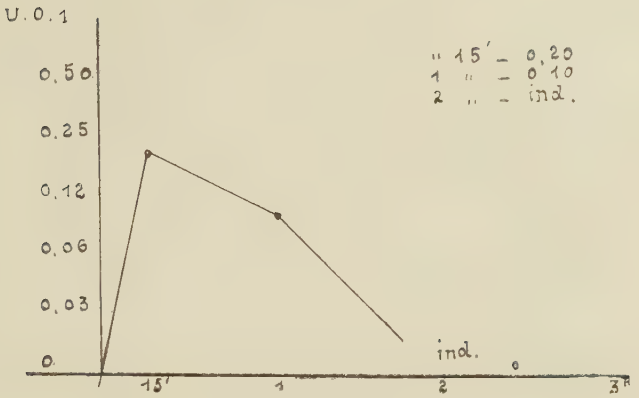


Figure 23 : Pneumonie chez une obèse

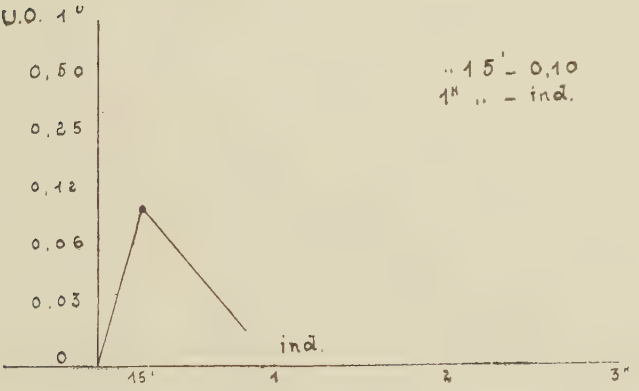


Figure 24 : Prostatite

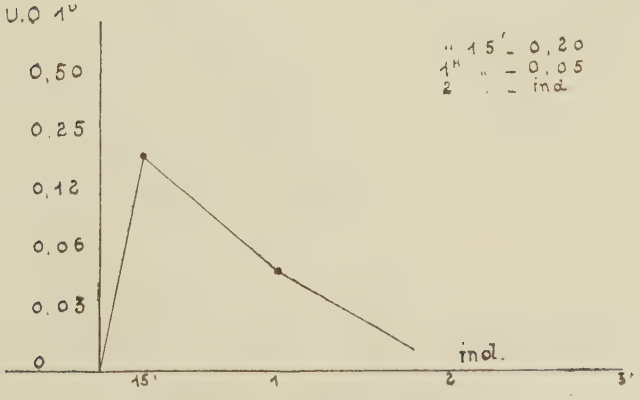


Figure 25 : Uréthrite aiguë

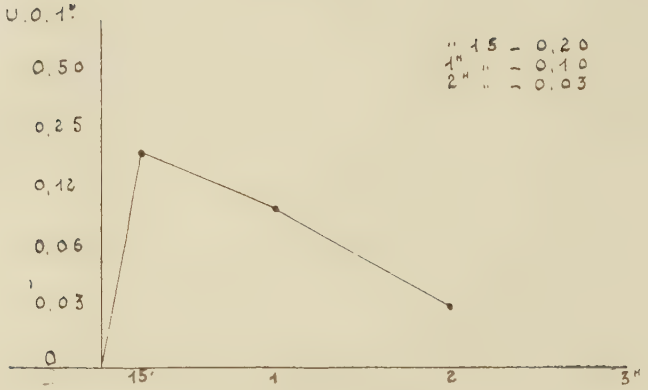


Figure 26 : Prostatite

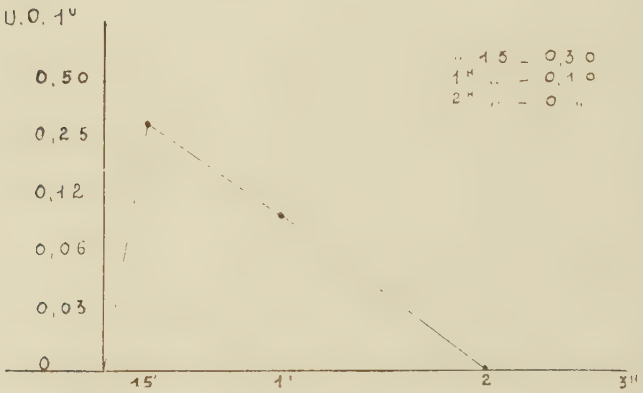


Figure 27 : prostatite

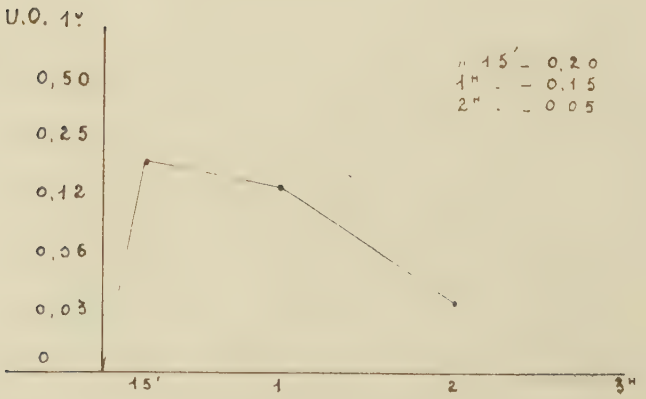


Figure 28 : Pleurésie

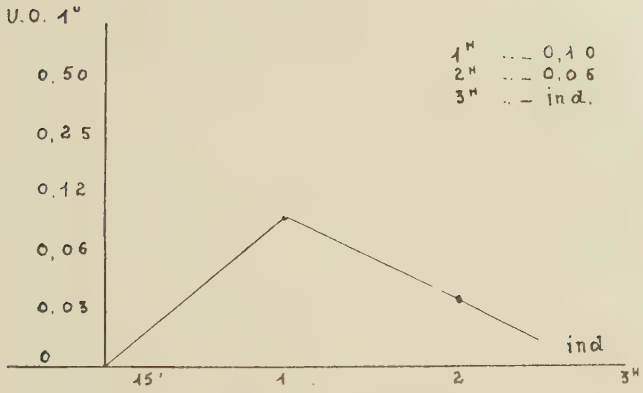


Figure 29 : Endocardite

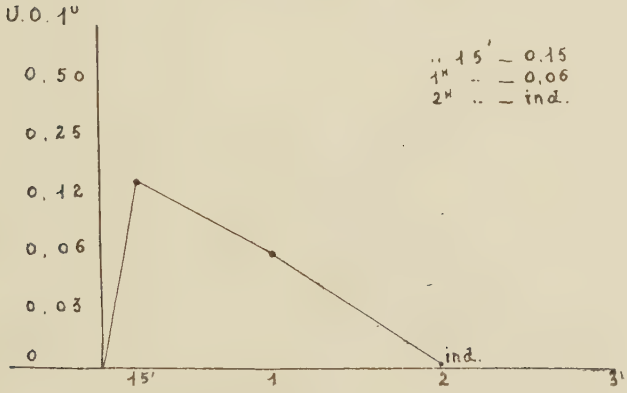


Figure 30 : Staphylococcie de la face

Ces faits sont extrêmement troublants. Des erreurs de la méthode ne sont pas en cause, les variations trouvées dépassant de très loin les erreurs possibles de la méthode. Il faut donc admettre qu'une même injection intramusculaire est susceptible de s'éliminer de façon très différente suivant les individus.

En résumé, on obtient avec 40.000 U.O. :

Un effet thérapeutique de 3 heures .. 30 %
Un effet thérapeutique de 2 heures .. 30 %
Un effet thérapeutique de 1 heure 30 .. 40 %

Ce dernier chiffre extrêmement considérable permet de se demander si les échecs de la Pénicillothérapie, en dehors de tous facteurs venant du terrain ou du germe, ne pourraient pas être dus en partie à ce facteur de la concentration sanguine.

Nous verrons plus loin dans des cas de gonococcie où les repaires anatomiques sont décelables et où les résultats peuvent être rigoureusement contrôlés, si la clinique apporte une réponse à cette interrogation.

Dans les deux derniers groupes de malades, c'est-à-dire dans 70 % des cas, si on veut rendre la Pénicillothérapie efficace, il faudra modifier complètement la forme du traitement, en changeant les voies d'injections, en augmentant le rythme ou en utilisant des solvants qui retardent l'élimination.

C. — *Injections intramusculaires de 20.000 U.O. par injection*

Bien que moins employées actuellement, ces doses le sont encore dans un grand nombre d'affections cutanées ou de maladies bénignes.

Là aussi, nous allons trouver des variations individuelles.

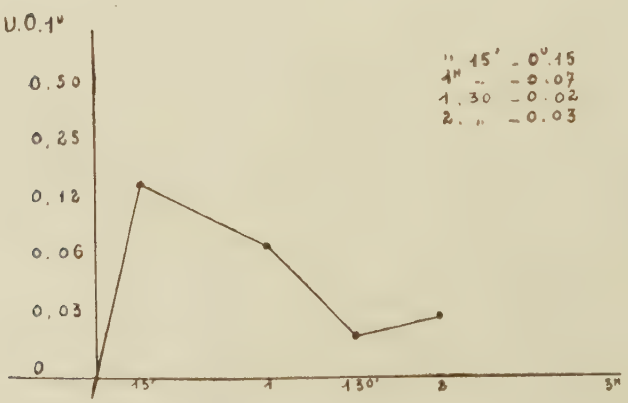


Figure 31 : Pneumopathie aiguë

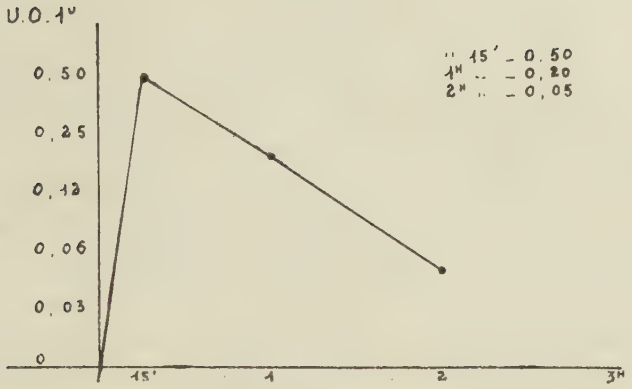


Figure 32 : Staphylococcie cutanée

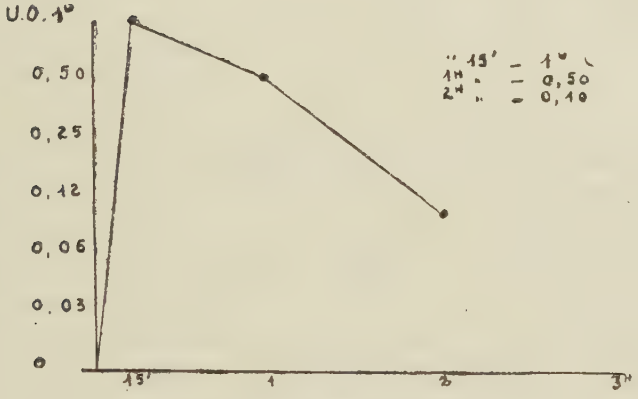


Figure 33 : Uréthrite aiguë

De toutes ces courbes d'élimination par voie intramusculaire, nous voudrions insister sur plusieurs faits : D'abord l'élimination de la Pénicilline ne varie pas considérablement avec les doses. Si l'on bâtissait des courbes avec les chiffres moyens obtenus avec 20.000, 50.000 et 100.000 U.O., elles se superposeraient dans l'ordre, mais avec des écarts non proportionnels. En multipliant par cinq une dose, on ne multiplie pas par cinq, ni le taux maximum obtenu, ni la durée d'élimination. En passant

de 20.000 à 100.000 U.O., le clocher passera par exemple de 0,60 à 1,10 U.O. et la durée d'élimination de deux heures à trois heures. L'inflation des doses depuis le début de la pénicillothérapie, ne se traduit donc en fait que par des variations peu considérables. Ensuite, les variations individuelles d'élimination annulent les variations provoquées par l'augmentation des doses et sont beaucoup plus importantes qu'elles. On arrive ainsi au phénomène paradoxal de voir une courbe d'élimination plus lente et des taux plus élevés, dans un cas où la dose injectée était de 20.000 U.O., que dans un cas où la dose était de 100.000 U.O. Enfin, ces variations individuelles sont telles et l'élimination est parfois si rapide, que l'effet thérapeutique est considérablement réduit, d'où la nécessité de connaître la courbe d'élimination, pour essayer de la corriger en agissant sur les facteurs que nous allons maintenant étudier.

Cette étude des facteurs humoraux ou organiques dont dépend l'élimination de la Pénicilline, serait très importante à entreprendre pour essayer de la modifier et d'augmenter le « rendement » de la Pénicilline dans l'organisme qui est, au fond, très mauvais. Peu d'hypothèses ont été soulevées, peut-être trouverait-on quelque chose dans les modifications physiques du sérum, telles que la viscosité. Le seul facteur bien mis en évidence est le *facteur rénal :*

Fleming, puis Rammelkamp constatèrent un allongement considérable de l'élimination dans les néphrites chroniques (fig. 34).

Nous avons recherché cet allongement chez un malade présentant un syndrome azotémique avec rétention chlorée sèche : Albumine urinaire : 1 gr. 80 ; urée sanguine, 1 gr. 65 ; constante d'Ambard, 0,21 ; chlore globulaire, 2 gr. 36 ; chlore plasmatique, 4 gr.; rapport, 0,59 (fig. 35).

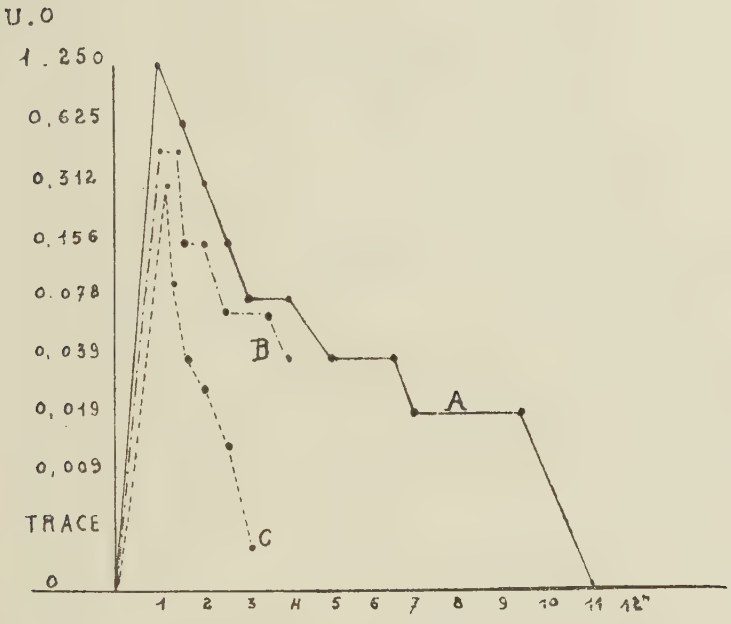


Figure 34 : Rammelkamp : Courbes A et B, néphrites chroniques. — Courbe C, sujet normal.

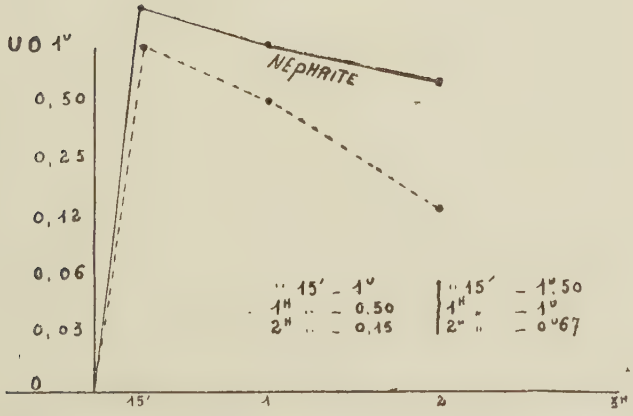


Figure 35 : Elimination dans une néphrite chronique comparée à celle d'un malade à rein normal.

Procédés utilisés pour retarder l'élimination de la Pénicilline après les injections intramusculaires

A. Blocage du rein. — La constatation du retard très important apporté à l'élimination de la Pénicilline dans les cas de lésion rénale, devait amener certains auteurs à essayer des substances susceptibles de réduire cette élimination. On a émis l'hypothèse que la Pénicilline ne passe pas seulement par le filtre glomérulaire, mais qu'elle est excrétée aussi par les tubes rénaux, et on a pensé que l'on pourrait diminuer cette élimination par blocage médicamenteux de la fonction rénale excrétoire.

C'est ainsi que Rammelkamp et Bradley ont essayé l'injection simultanée de Pénicilline et de diodrast et constaté une élimination de 20 % seulement, contre 60 % chez le sujet de contrôle.

Berger et ses collaborateurs ont étudié l'effet de l'acide para-amino-hippurique, sur le blocage de l'excrétion rénale de la Pénicilline. Ils choisirent cette substance à cause de sa toxicité réduite. Ils obtinrent ainsi une prolongation des courbes jusqu'à sept et huit heures sans danger notable.

Cependant, si cette méthode peut à la rigueur être utilisée chez des sujets en bon état apparent et des affections demandant un traitement de courte durée, on hésitera toujours à l'employer pour les affections graves où l'élimination rénale joue un rôle si important dans le pronostic.

B. Vasoconstriction locale. — Le fait que la Pénicilline s'élimine d'autant plus rapidement qu'elle est placée dans une région mieux vascularisée, a donné à penser qu'en amenant une vaso-constriction au point d'injection on retarderait cette élimination.

M. Trumper et R. M. Mutter ont prolongé son élimination en plaçant une poche de glace sur la région où avait été faite l'injection. Ils appliquent, par exemple, la

glace pendant une heure, font l'injection intramusculaire de 50.000 U.O., et pendant les cinq autres heures maintiennent cette poche. Ils ont ainsi réussi à maintenir le taux bactériostatique dans le sang, pendant six à douze heures. Ils citent dix cas de gonococcie guéris par ce procédé.

Roy et ses collaborateurs ont utilisé de petites quantités d'Adrénaline permettant de maintenir le taux plus élevé. Cependant, cette Adrénaline aurait un effet inactivant sur la Pénicilline.

Enfin, Parkins mélange la Pénicilline à un vasoconstricteur, le chlorhydrate de L-*a* hydroxy *b* méthyl aminohydroxy-éthylbenzène. Une injection de 50.000 U.O. permettrait ainsi de maintenir un taux bactériostatique dans le sang pendant sept à huit heures.

C. Mélanges huileux. — De très nombreux auteurs se sont efforcés de remplacer le sérum physiologique servant ordinairement aux injections, par un solvant susceptible de retenir un peu plus de Pénicilline.

Parmi les solvants huileux, le plus intéressant est le produit préparé par Romansky et Rittman. C'est un mélange d'huile d'arachide et de 4 % de cire d'abeilles. Cette préparation est stable à la température ordinaire et conserve son activité pendant trente à soixante jours à la température de 37°. Si ce produit a l'immense avantage de réduire le rythme des injections à une injection par jour, il n'est pas sans inconvénients. D'abord, avant l'injection, il faut fluidifier le mélange à une température suffisante ne détruisant pas la Pénicilline et injecter ensuite rapidement. La solidification se produit assez fréquemment au contact d'une trace d'humidité, et les injections sont souvent émaillées d'incidents. Mais surtout chaque injection laisse persister après elle un nodule huileux douloureux. Pour ces raisons, il est difficile à employer pour un traitement prolongé. Par contre, il est excellent pour les traitements ambulatoires et il semble

être employé sur une vaste échelle en Amérique dans le traitement de la Blennorrhagie, par une seule injection de 200.000 U.O.

L'allongement de la courbe d'élimination est très net (fig. 36). On avait injecté chez ce malade 40.000 U.O. de Pénicilline en solution aqueuse. Le lendemain, on injecte une heure après la première injection, 200.000 U.O. de « Romansky-Pinut-Oil ».

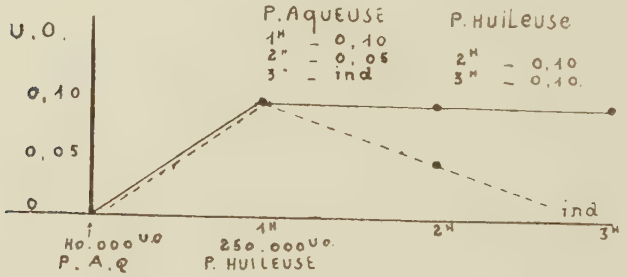


Figure 36. : Relèvement d'une courbe de Pénicillinémie par une injection de Pénicilline huileuse.

Si on étudie l'élimination complète d'une seule injection de 200.000 U.O., on voit qu'elle s'étale sur vingt-quatre heures.

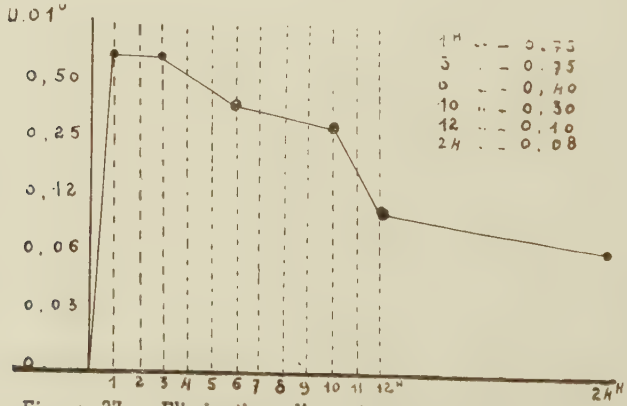


Figure 37 : Elimination d'une injection intramusculaire de 200.000 U.O. de « Romansky Pinut Oil ».

On voit que ce solvant-retard a une action extrêmement efficace, étant capable de maintenir un taux thérapeutique pendant près de vingt-quatre heures. Mais, en dehors de la réduction considérable du nombre d'injections par jour et de la dose totale nécessaire, ce mélange huileux a sur les injections faites toutes les heures avec un solvant aqueux, un avantage très net. Il supprime les passages si longs, pouvant aller jusqu'à une heure trente à deux heures, avec des doses sous-thérapeutiques. Nous n'ignorons pas que Bigger a préconisé des traitements discontinus pour permettre à des germes passés à l'état de latence, sur lesquels la Pénicilline n'aurait pas d'action et qu'il appelle des « persisters », de se multiplier et d'être tués ensuite. Nous pensons qu'il ne s'agit que d'une hypothèse, moins étayée que celle de la possibilité pour un germe d'acquérir une résistance quand il est placé à des doses sous-thérapeutiques et qu'un traitement continu reste préférable. C'est ce traitement continu qui est le mieux réalisé par ce solvant huileux.

D'autres huiles ont été employées comme l'huile coton par Libby, tandis que Harwood proposait l'œuf cru. D'autres ont employé la gélatine, l'agar, la méthyl-cellulose avec des succès variables.

D. Poly-Vinyl-Pyrrolidone. — Ce produit de poids moléculaire élevé (5.000) et de viscosité très grande, commercialisé sous le nom de « Subtozan » était utilisé en solution isotonique pour les perfusions intraveineuses.

Sa solution hypertonique à 20 ou 25 % peut être utilisée comme solvant de la Pénicilline ordinaire colorée ou de la Pénicilline G. Bien qu'assez visqueux, il ne présente ni les difficultés d'injections, ni les nodules douloureux des solutions huileuses.

Nous avons comparé chez plusieurs malades l'élimination d'injections de 40-50.000 U.O. en solution aqueuse et en solution avec la P.V.P.

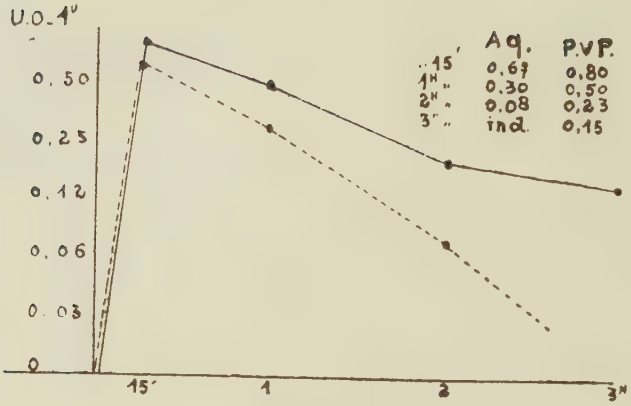


Figure 38

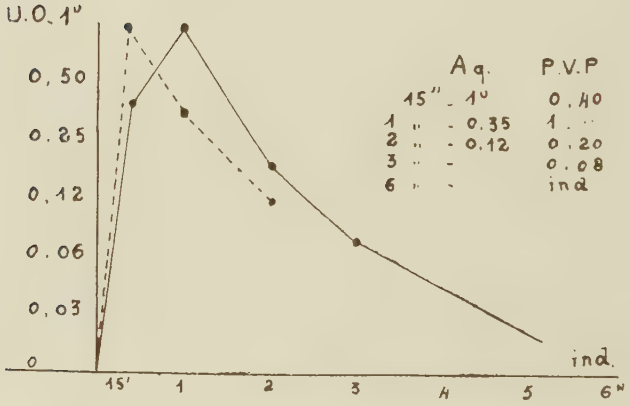


Figure 39

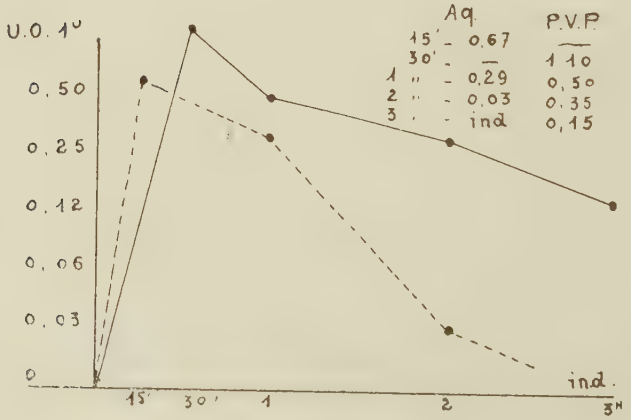


Figure 40

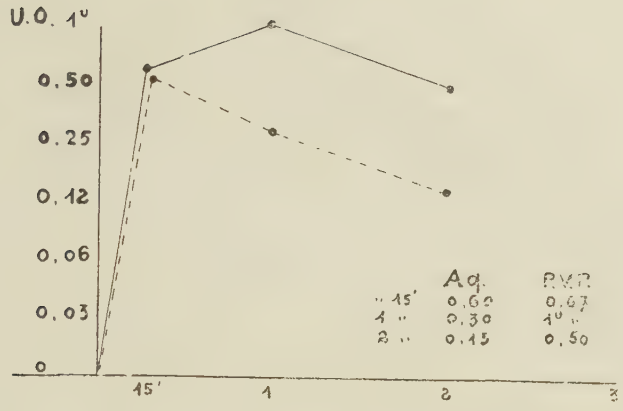


Figure 41

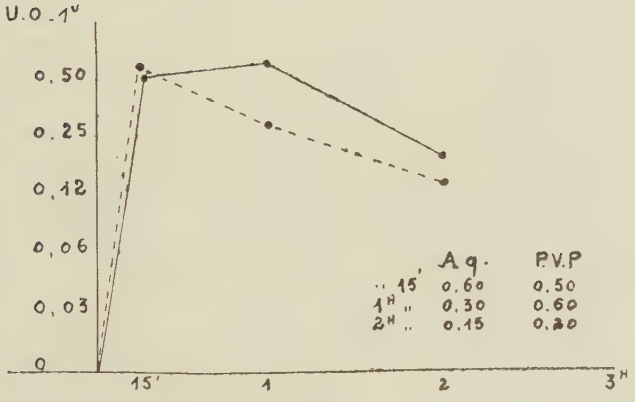


Figure 42

Sur une seule de ces courbes d'élimination nous avons pu étudier l'élimination complète qui a été d'environ cinq heures trente. Des essais isolés nous ont donné des chiffres analogues donnant très souvent un taux appréciable à la quatrième et à la cinquième heure. Dans les cas où nous avons été obligé de cesser notre observation au bout de deux ou trois heures le taux obtenu est élevé, presque toujours au-dessus de 0,20 U.O., ce qui permet de prévoir que la Pénicilline s'éliminera encore pendant près de deux ou trois heures.

La P.V.P. a donc une action retardatrice très nette qui permettrait de diminuer de moitié les injections en vingt-quatre heures, tout en maintenant un taux thérapeutique beaucoup plus constant. Il nous a même semblé que la P.V.P. amortissait un peu les variations individuelles.

Cependant, elle n'échappe pas à ces variations complètement, et dans deux cas, l'élimination avec P.V.P. n'a pas dépassé deux heures (fig. 43 et 44).

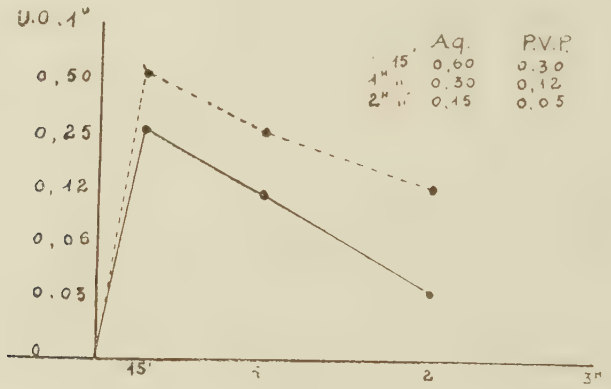


Figure 43

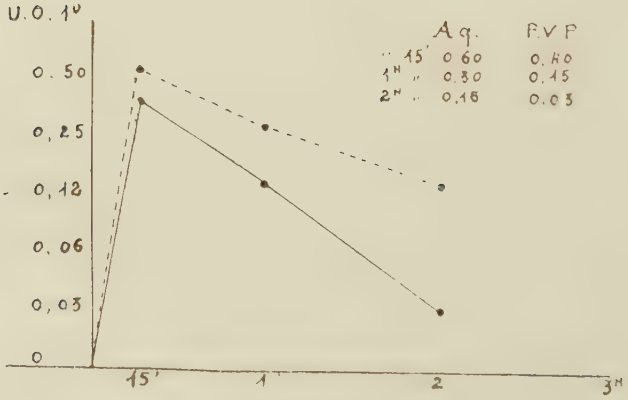


Figure 44

N.-B. — Les quatre dernières courbes 41, 42, 43 et 44, établies pour une injection de Pénicilline avec P.V.P., sont comparées sur les graphiques avec une courbe standard de Pénicilline en solution aqueuse.

On voit donc qu'il s'agit là d'un solvant excellent, qui doit passer dans la pratique courante, mais qui ne dispense pas du contrôle des concentrations.

Nous sommes persuadés que la recherche des véhicules-retard ouvre en Pénicillothérapie une voie nouvelle susceptible d'augmenter considérablement son action.

Perfusion intraveineuse

Dans les affections graves nécessitant un traitement intense, devant la difficulté d'obtenir par injection intramusculaire un taux élevé de Pénicilline dans le sang, on s'est adressé à la voie intraveineuse en perfusion continue.

Nous avons contrôlé plusieurs taux sanguins chez des malades traités par 800.000 U.O. de Pénicilline diluée dans un litre de sérum physiologique ou de subtozan isotonique en goutte à goutte pendant douze heures.

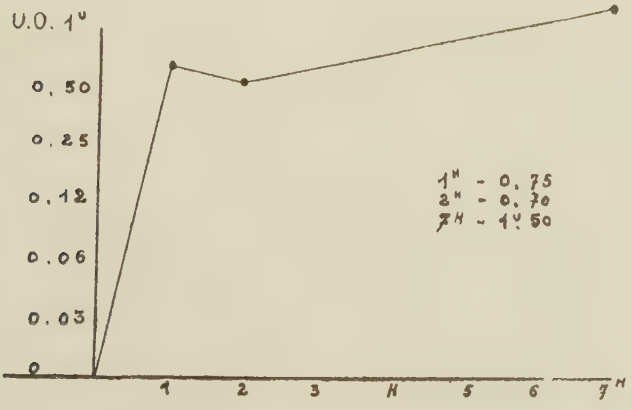


Figure 45: Perfusion de 800.000 U.O. dans un litre de sérum

Divers contrôles isolés nous ont donné des chiffres de 3,75 U.O., 2 U.O., 2,50 U.O.

Un cas intéressant a été la perfusion de 1.000.000 U.O. par un drain allant au voisinage d'un foyer de fracture ouverte sur lequel on était intervenu.

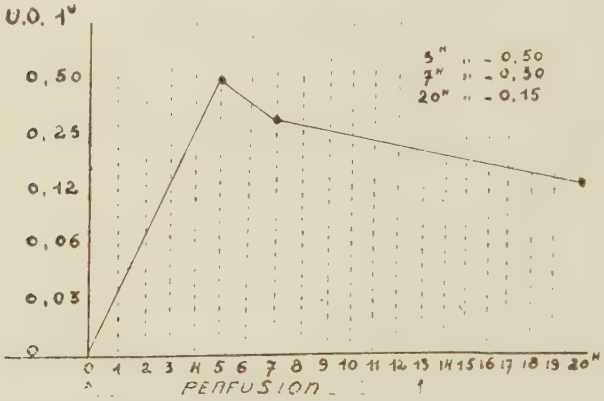


Figure 46 : Perfusion dans un drain au voisinage d'un foyer de fracture.

Comme nous le verrons plus loin, les résultats cliniques ont toujours été très parallèles à l'augmentation du taux ainsi obtenu.

Injections dans les cavités closes

Il nous a paru intéressant d'étudier les taux de pénicillinémie obtenus au cours des injections locales dans les cavités closes.

I. - Injection intrapleurale. — Il est classique d'admettre que la Pénicilline franchit mal les barrières séreuses. Cependant, l'élimination de la Pénicilline en dehors d'une cavité pleurale ou d'une articulation s'effectue en un temps variable suivant l'état de cette cavité. Il en passe donc dans le sang une certaine quantité qu'il est intéressant de connaître.

Rammelkamp et Keefer ont donné dès 1943 des chiffres de cette élimination.

Ainsi, après 10.000 U.O. intrapleurale on a :

30	minutes	0
90	»	0,007
135	»	0,019
225	»	0,039
380	»	0
460	»	0,007

On voit qu'elle est assez irrégulière.

Quelques essais isolés ne nous ont pas permis de bâtir des courbes.

Sur douze dosages, dix nous ont donné des quantités indosables trois et quatre heures après l'injection.

Dans un dosage après 100.000 U.O. intrapleural, le sang contenait 2 heures 30 après l'injection 0,10 U.O.

Dans un autre, après 30.000 U.O. on trouvait dans le sang une heure trente après 0,05 U.O.

Nous ne croyons pas qu'il est possible de compter sur cette élimination pour s'abstenir de faire un traitement intramusculaire quand il est nécessaire.

II. - Injection intraperitoneale. — Dans une perfusion par drain, les taux obtenus atteignaient 0,05 U.O. six heures et dix heures après le début.

III. - Injection intra-articulaire. — Rammelkamp a donné les chiffres suivants :

5- 15	minutes	0
25- 55	»	0,007
70-180	»	0,019
210-240	»	0,007

Tous ces passages sont donc extrêmement faibles et irréguliers.

Injections intra-utérines

Les taux de pénicillinémie sont extrêmement intéressants car leur variation est explicable par les manœuvres endo-utérines opérées.

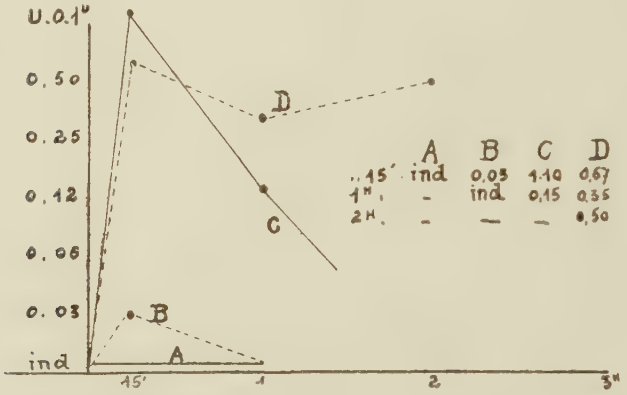


Figure 47 : Injection de 200.000 U.O. intra-utérine chez quatre malades.

Malade A. — Injection de 200.000 U.O. de Pénicilline sans manœuvres endo-utérines, après pose d'une laminaire chez une malade présentant une cervicite blennorrhagique. Cet essai effectué comme contrôle, a montré que l'utérus s'est comporté comme une cavité close et n'a laissé passer aucune quantité de Pénicilline dans le sang.

Malade B. — Injection de 200.000 U.O. de Pénicilline après curage digital pour avortement du troisième mois. La muqueuse respectée n'a laissé passer que très peu de Pénicilline pendant un quart d'heure au niveau de l'insertion placentaire.

Malade C. — Injection de 200.000 U.O. de Pénicilline après curetage avec raclage complet de la muqueuse. Le taux très élevé obtenu un quart d'heure après se rapproche de l'injection intraveineuse classique.

Malade D. — Injection de 200.000 U.O. de Pénicilline. Après curetage soigné pour un avortement infecté, les sinus utérins étant largement ouverts. L'utérus s'est comporté comme un réservoir et les taux obtenus se rapprochent d'une perfusion. Dans ces deux derniers cas, on peut espérer un effet thérapeutique général.

Aérosols

Dans les traitements effectués par cette voie, la dose réellement absorbée par le malade est toujours difficile à fixer. Le dosage de la pénicillinémie et le taux urinaire renseignent utilement sur cette dose.

Ainsi, après un aérosol de 50.000 U.O. de Pénicilline, on trouvait dans le sang un quart d'heure après 0,07 U.O. et dans l'urine 8 U.O. par cc.

En multipliant le taux urinaire par la quantité excrétée, on peut établir facilement cette dose absorbée.

CHAPITRE V

ETUDE DES CONCENTRATIONS DANS DIVERS LIQUIDES ORGANIQUES

Les chiffres que nous allons donner ne présentent en eux-mêmes, rien de très original. Ils ont depuis longtemps été apportés par de très nombreux auteurs et servent pour les traitements standards appliqués en clinique pour tous les malades traités. Mais nous croyons justement que les traitements standards appliqués en l'absence d'une méthode de dosage vraiment clinique, comme la méthode de B. Sureau, ne constituent qu'un pis-aller. Le seul critère clinique, s'il a toujours la plus grande valeur et doit décider en dernier ressort, est souvent incertain et a tout à gagner à s'appuyer sur le contrôle du laboratoire. Car là encore les variations individuelles d'élimination peuvent diminuer considérablement l'effet thérapeutique.

En effet, si grossièrement les barrières séreuses laissent mal passer la Pénicilline, ce passage n'est pas nul. Une hydarthrose survenue au cours d'une septicémie traitée par 300.000 U.O. par jour intramusculaire et 200.000 U.O. en perfusion intraveineuse de douze heures, avait dans le liquide articulaire un taux de 0,20 U.O. Inversement, nous avons déjà vu que 100.000 U.O. mis dans une

plèvre de pleurésie réactionnelle laissaient passer dans le sang un taux de 0,10 U.O.

a) Injections intrapleurales

Chez un malade atteint de pleurésie séro-fibrineuse, nous avons titré le taux de Pénicilline intrapleurale après une injection de 40.000 U.O.

30 heures après ..... 0,80 U.O.
80 heures après ..... 0,15 U.O.

Par contre, chez un malade à peu près identique, une injection de 20.000 U.O. a donné 0,20 U.O. vingt-quatre heures après.

Enfin, un troisième malade qui avait reçu une injection de 20.000 U.O. dans sa plèvre, n'en possédait plus vingt-quatre heures après Il est à remarquer qu'il s'agit du même malade, chez qui une injection de 100.000 U.O. intramusculaire faisait apparaître un taux de 0,10 dans sa plèvre.

La perméabilité séreuse est donc sujette à de grandes variations et si l'on veut au cours du traitement maintenir un taux constant et élevé, il est nécessaire de le contrôler.

b) Injections intrarachidiennes

Comme la plèvre, la barrière méningée ne semble pas se comporter d'une manière constante chez tous les sujets. Les premiers chiffres donnés par Rammelkamp et Keefer portaient sur des individus normaux ; après une injection de 20.000 U.O. intraveineuse, ils ne retrouvaient pas de Pénicilline dans le liquide céphalo-rachidien. Herrel injectant ensuite, toujours chez des sujets normaux, 10.000 U.O. dans le rachis, en retrouvait 0,06 U.O. par cc. vingt-quatre heures après.

Chez les méningitiques, la situation serait différente. Sylvester et Rosenberg ont obtenu des taux importants dans le L.C.R. après des injections intraveineuses ou intramusculaires.

Doses	Prélèvements	taux U.O.
20.000 U.O. IV	60 minutes	0,35
— — IV	120 »	0,03
— — IM	120 »	0,03
40.000 U.O. IV	90 »	0,32
— — IV	125 »	0,26
— — IV	125 »	0,09
— — IV	75 »	0,04
— — IM	140 »	0,26

En se basant sur le fait que dans le sérum, 0,19 U.O. par cc. serait nécessaire et suffisant pour inhiber le streptocoque hémolytique, et 0,156 U.O. pour les staphylocoques sensibles, ils déclarent que la Pénicilline intraveineuse et intramusculaire est suffisante.

Malgré cette opinion, la voie rachidienne a prévalu. Chez deux malades non méningitiques traités par des doses importantes de Pénicilline atteignant 1.000.000 d'unités par jour, donc très supérieures à celles utilisées primitivement par Rammelkamp, nous n'avons pas trouvé de taux dosable dans le L.C.R.

Dans une réaction méningée chez un malade atteint de sinusite frontale traitée par 320.000 U.O. par jour en injections intramusculaires, sur trois dosages, nous n'avons trouvé qu'une fois un taux de 0,03 U.O. Enfin, dans deux méningites, l'une à pneumocoque, l'autre à méningocoque, quand le traitement intramusculaire seul a été pratiqué, nous n'avons jamais retrouvé de Pénicilline dans le L.C.R.

Par contre, avec un traitement local, en retirant une certaine quantité de liquide et en le remplaçant par une

solution de Pénicilline, elle donne des taux importants. Cependant, les taux trouvés sont loin d'être constants. Dans une méningite à pneumocoques traitée par 300.000 U.O. intramusculaires et par 40.000 U.O. intrarachidiennes, nous avons trouvé vingt-quatre après la première injection, à peine 0,03 U.O., après la seconde, le taux était monté à 0,50 U.O. Il s'y est maintenu après la troisième et on a ensuite interrompu le traitement local, les signes ayant regressé.

Une méningite à méningocoques ayant reçu le premier jour de son entrée à l'hôpital deux injections de 20.000 U.O., avait vingt-quatre heures après, un taux de 1,10 U.O. environ. Le traitement fut continué par une seule injection de 40.000 U.O. dans le rachis avec des taux de 0,67 U.O. et 1 U.O.

Les variations de perméabilité que nous n'avons pu observer que chez un nombre trop faible de malades montrent comme ailleurs, la nécessité d'un contrôle, si on veut maintenir une dose thérapeutique.

CHAPITRE VI

APPLICATIONS CLINIQUES
FACTEURS INFLUANT SUR LE RESULTAT

Les importantes variations individuelles de concentration (avec des doses égales de Pénicilline) que nous venons de décrire, font prévoir la valeur que pourrait avoir ce facteur sur l'efficacité du traitement. Mais il n'est pas le seul, ni le plus important.

Au cours d'un syndrome infectieux quel qu'il soit, indépendamment des facteurs propres au germe : vitalité, virulence, génie épidémique, ou propres au malade : terrain, hérédité, immunité, ceux susceptibles d'influer sur la réussite d'un traitement pénicillé peuvent grossièrement être groupés en trois catégories :

I. — Facteur anatomique

La Pénicilline ne réagit pas dans le corps humain comme dans un tube à essai, bien qu'on l'ait prétendu, d'autant plus que sa molécule assez volumineuse se répartit dans le corps d'une manière très irrégulière.

Des titrages sur des cobayes ont montré des concentrations extrêmement variables : maxima pour le rein, la

vésicule biliaire ou la peau ; minima, au contraire, pour le cerveau. Même dans les cas apparemment les plus simples, d'une méningite, d'une pleurésie ou d'une arthrite, ces cavités ne se comportent pas à la manière d'un récipient clos.

A plus forte raison, dans le cas d'une localisation septico-pyohémique, d'une localisation pulmonaire enkystée, ou surtout d'un foyer d'endocardite, quelle sera la concentration obtenue à ce niveau ?

Il est impossible de le savoir et le sérum sanguin ne sera qu'un témoin très imparfait de cette imprégnation de l'organisme par le médicament. Il n'est pas certain, même, que ce taux sanguin varie parallèlement aux autres.

Il y a donc une notion de repaire anatomique, primordiale en pénicillothérapie. Dans les endocardites, notamment, le fait de vouloir baser un pronostic sur la seule sensibilité du germe et la concentration sanguine, n'a pas abouti à des résultats probants.

Ainsi, la recherche des repaires est essentielle.

C'est une affaire clinique pour laquelle le laboratoire apporte une aide médiocre ; cependant, son rôle n'est pas nul.

Il est des cas, nous le verrons plus loin, où la Pénicilline étant normalement éliminée et le germe sensible, le traitement n'apporte pas le résultat escompté ; cette anomalie peut faire rechercher avec plus de soin le repaire anatomique. On n'est pas entièrement désarmé devant lui et une intervention peut viser à l'éliminer ou à le draîner ; ou bien le traitement local, adjuvant indispensable chaque fois qu'il est possible, permet d'aller porter in situ la Pénicilline.

Donc, en raison de la diffusion médiocre, on peut dire même, du mauvais rendement de la Pénicilline si l'on compare les taux obtenus aux doses injectées, la recher-

che soignée des régions enkystées est nécessaire pour appliquer un traitement local sans lequel la guérison ne sera pas obtenue.

II. — Sensibilité du germe

Elle joue aussi un grand rôle.

Nous avons vu que vouloir compter sur une sensibilité standard d'une race microbienne était une erreur ; il y a des sensibilités particulières pour chaque souche et pour chaque germe pathogène isolé chez un malade. Elles sont extrêmement utiles à connaître et peuvent commander toute la thérapeutique. Expérimentalement, le danger des doses sous-thérapeutiques est très grand. Et s'il est difficile de conclure que la sensibilité d'un germe est la même in vivo et in vitro, la sensibilité in vitro est tout de même un témoin de valeur.

Nous aurions voulu pousser cette étude plus complètement. Malheureusement les prélèvements étant effectués souvent après le début du traitement, il ne nous a pas été possible de recueillir, en l'absence de Pénicillinase, l'agent pathogène. Dans le cas des gonococcies, notamment, ayant déjà été traitées par des sulfamides, les germes refusaient de pousser, même sur des milieux contenant de l'acide para-amino-benzoïque, alors que les frottis étaient encore positifs. C'est le cas aussi des endocardites malignes que nous avons pu observer ; elles avaient toutes reçu des millions d'unités qui, si elles ne les avaient pas totalement guéries, avaient du moins négativé leur hémoculture.

Chaque fois cependant que nous avons pu contrôler cette sensibilité, elle s'est montrée d'un très grand intérêt.

III. — Concentration des liquides organiques

C'est un renseignement plus facile à obtenir que les précédents, susceptible d'apporter une aide précieuse à la conduite du traitement.

En effet, même en l'absence d'un calcul précis de la sensibilité du germe, elle permet de maintenir des doses largement thérapeutiques pour que la majorité des souches soit inhibée. Elle permet aussi d'indiquer la nécessité de voies d'introduction plus actives, comme la perfusion intraveineuse, ou l'emploi de véhicules-retards, comme les différents composés huileux ou la poly-vinyl-pyrrolidonne.

Nous allons maintenant donner quelques observations personnelles dans lesquelles quelques-uns de ces facteurs se sont présentés et ont été étudiés. Malheureusement, trop rarement les trois facteurs se sont trouvés réunis.

OBSERVATION I

PLEURESIE PURULENTE A STREPTOCOQUE

C... Pierre, 18 ans. — Entré en février 1946 pour un syndrome infectieux fébrile caractérisé par des céphalées avec obnubilation, une légère angine érythémateuse et des douleurs articulaires. Pendant dix jours, la température s'éleva progressivement jusqu'à 38°5 - 39°, avec de petites oscillations. Les douleurs articulaires s'intensifièrent, d'abord maxima au niveau d'un genou et d'un coude, atteignant ensuite les petites articulations des mains ; puis elles régressèrent. En même temps, les céphalées et l'obnubilation augmentèrent avec quelques signes méningés, mais un liquide céphalo-rachidien normal.

Le dixième jour, la température s'éleva franchement à 40°, décrivant alors de grandes oscillations. Une hémoculture pratiquée à ce moment fut négative.

Enfin, le dix-septième jour, un point de côté thoracique précéda l'apparition d'un épanchement purulent abondant, contenant un liquide verdâtre louche, avec streptocoque hémolytique en culture pure.

La pénicillo-sensibilité du streptocoque, pratiquée par la méthode du dilution en bouillon - ascite, montra qu'il était inhibé seulement à une dose de 0,40 U.O. par cc.

En employant la notation de Lichtwitz et Bernal, le staphylocoque Londres étant inhibé par une concentration de 0,03 U.O., son index de sensibilité était de 13 environ.

Il s'agissait donc d'un germe assez résistant.

Un traitement général de 160.000 unités par jour, associé à de la thiazomide, fut institué. En même temps, des ponctions furent pratiquées tous les jours pendant 15 jours.

On retira, au début, des quantités variant entre 200 cc. et 500 cc. et les derniers jours des quantités décroissantes.

20.000 U.O. de Pénicilline furent injectées chaque fois. Malgré ce traitement, les streptocoques persistèrent dans presque tous les liquides retirés. Le traitement pénicillé général fut continué pendant 48 jours.

Nous n'avons pas pu, à cette époque, titrer le taux sanguin et pleural obtenu, ce qui aurait permis un rapprochement intéressant. Cependant, l'efficacité de ce traitement, et en même temps son intensité et sa durée, s'accordent assez bien avec la sensibilité du germe.

OBSERVATION II

SEPTICEMIE A STREPTOCOQUE

D... Jeanne, 62 ans. — Entrée le 6 décembre 1946, pour un syndrome aigu fébrile ayant débuté le 28 novembre par des frissons.

Température à 40°, en plateau depuis le début.

Etat général extrêmement grave, avec amaurose totale le lendemain, vraisemblablement due à une uvéite septique, avec iridocyclite. Fuliginosités tapissant la bouche.

Bruits du coeur très sourds. Arthrite du genou gauche.

Urines rares hématuriques.

Une hémoculture pratiquée à son entrée montra un streptocoque hémolytique. Sa pénicillo-sensibilité, par la méthode de dilution, montra qu'il était inhibé à une concentration de 0,06 U.O. Son index de sensibilité était donc de 2.

Un traitement pénicillé immédiatement institué amena la chute de la température à 37°5 dès le lendemain, avec une importante débâcle urinaire.

Le traitement fut constitué par injections de 200.000 unités par jour en perfusion intraveineuse et 500.000 unités en intramusculaire. A ce moment, le taux était voisin de 3 U.O.

Quelques jours plus tard, alors que la malade ne recevait plus que 200.000 unités par jour, on trouva dans son sang des taux assez importants, nettement supérieurs au taux d'inhibition du germe (fig. 48).

Figure 48 : Septicémie à streptocoque. Taux d'inhibition du germe et concentrations obtenues.

L'arthrite du genou, ponctionnée après 4 jours de traitement I.V. et IM. montra un taux de 0,20 U.O. (liquide citrin amicrobien).

Une injection locale de 20.000 unités amena très rapidement sa résolution.

L'amélioration de la courbe thermique persista; l'état général s'améliora aussi progressivement.

Par contre, les lésions oculaires définitives subsistèrent. Les bruits du coeur, sourds au début, augmentèrent; mais au bout de dix jours apparut un souffle diastolique en jet de vapeur, signant l'endocardite. En même temps, la température s'éleva légèrement au-dessus de la normale.

La malade sortit après avoir reçu 13.000.000 d'U.O.

Il s'agissait donc d'une septicémie à streptocoque hémolytique, sensible à la Pénicilline, à allure sévère, avec trois localisaitons : oculaire, cardiaque et articulaire.

Le traitement, appliqué neuf jours après le début, chez cette malade qui avait un taux thérapeutique pendant 2 h. 30, alors que les localisations étaient constituées, amena la guérison brutale du syndrome septicémique.

Le traitement local apporta la résolution rapide de la localisation articulaire; l'effet fut donc très favorable sur ce qu'il était possible d'atteindre. Mais, par contre, les lésions oculaires ne régressèrent pas — et au niveau de l'endocarde valvulaire s'était créé soit une lésion définitive, soit un repaire anatomique qui résista au traitement et évolua pour son propre compte.

OBSERVATION III

ABCES DU POUMON

D..., 26 ans. — La maladie commença fin novembre 1946, par un point thoracique droit, accompagné d'une légère élévation de température.

Quelques jours après apparut un syndrome de condensation du lobe supérieur droit avec souffle tubaire de l'espace omo-vertébral droit.

Une radiographie montra la présence d'une bande juxta-médiastinale non homogène. Cette bande s'étendit les jours suivants à toute la surface de ce lobe et présenta une image d'hyperclarté dans sa partie moyenne avec un niveau liquidien. Un traitement avec 200.000 unités de Pénicilline intramusculaire n'amena aucune diminution de la courbe thermique. Une courbe d'élimination montra à ce moment :

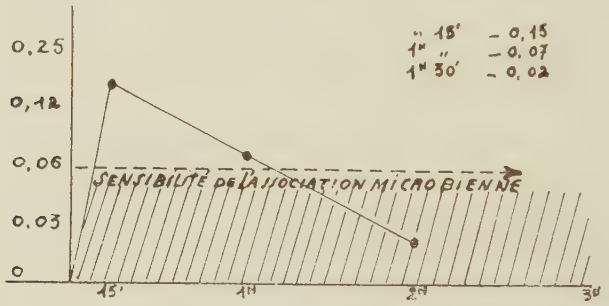


Figure 49 : Abcès du poumon. Taux d'inhibition du germe et concentrations obtenues.

Le 25 décembre, vomique brutale suivie d'une rémission brusque de la température — mais le malade continue à faire des clochers thermiques de rétention qui précédent chaque fois une nouvelle évacuation purulente.

L'état général ne s'améliore pas et l'évolution n'est pas plus favorable, malgré le traitement pénicilliné.

On pratique alors deux bronchoscopies avec broncho-aspiration de la bronche lobaire supérieure droite et injection de 50.000 U.O. Le pus retiré contient une flore abondante et variée composée de cocci de type staphylocoque, streptocoque et pneumocoque. Une séparation microbienne permet d'éliminer un staphylocoque blanc, vraisemblablement non pathogène et on reste en présence d'un mélange composé d'un streptocoque non hémolytique et d'un pneumocoque.

La séparation ne fut pas plus poussée et l'on titra la sensibilité du mélange, étant donné qu'il n'était pas possible d'indiquer l'élément pathogène.

Cette association strepto-pneumocoque en bouillon ascite-glucose fut inhibée à une concentration de 0,06 U.O.. Le staphylocoque étalon étant à 0,03 U.O., l'index de sensibilité était donc de 2.

Les injecions faites avec le bronchoscope amenèrent une grosse amélioration et le malade sortit, alors qu'il ne subsistait plus qu'un voile sous-claviculaire.

En résumé, il s'agissait d'un germe ou d'une association très sensible à la Pénicilline chez un malade qui maintenait des doses très faiblement thérapeutiques.

Dans cet abcès, constituant un véritable repaire anatomique, la guérison ne fut obtenue qu'après drainage et traitement local.

OBSERVATION IV

B... René. — Le début des troubles remontait à un an et demi, temps pendant lequel le malade avait constitué progressivement une endocardite typique avec périodes fébriles de plus en plus intenses, souffles cardiaques assez variables et panaris d'Ossler.

L'affection avait été signée par deux hémocultures positives, la dernière un mois avant l'entrée du malade à l'hôpital, en décembre 1946, pour un nouveau séjour.

Il présentait alors une température irrégulière aux environs de 37°5 - 38°, qui depuis trois mois environ n'avait subi aucune rémission, malgré un traitement pénicillé intensif de 1.000.000 U.O. par jour.

La dose totale injectée jusqu'alors, du reste, était de 130.000.000 d'unités.

Une courbe pratiquée à ce moment-là montra une élimination assez rapide. On essaya alors d'élever ce taux par des perfusions quotidiennes de 800.000 U.O. dans un litre de sérum en 12 heures. Les taux se maintinrent aux environs de 1 U.O.

Au bout de 48 heures, la température redevint normale pour la première fois, et une hémoculture s'avéra négative, aussi pour la première fois.

Six perfusions analogues furent pratiquées. On continua le traitement par quatre injections I.M. de 100.000 U.O. de Spécilline G., dans la P.V.P. hypertonique à 20 %, par jour.

Les taux restèrent aussi élevés et les résultats obtenus persistèrent.

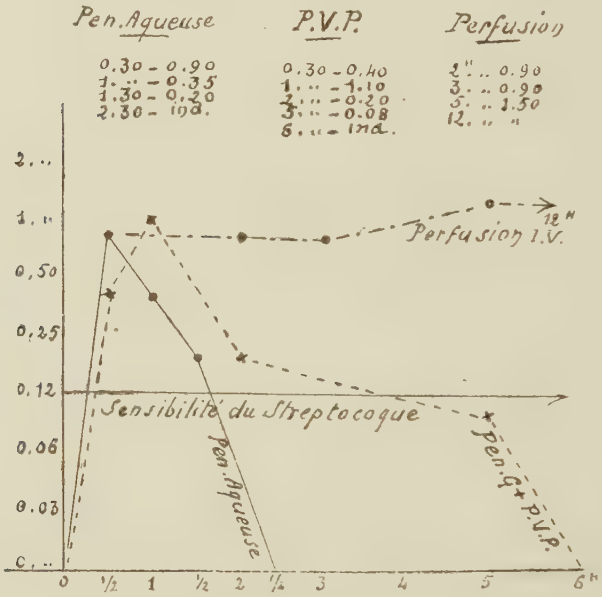


Figure 50 : Taux au cours d'une endocardite

Revenu à l'hôpital après 3 mois, l'amélioration s'était maintenue.

Une élévation très importante du taux sanguin, par perfusion d'abord, en employant ensuite une pénicilline G très active, avec un véhicule-retard, paraît nettement avoir été à l'origine de cette amélioraion.

Toutes ces observations montrent l'intérêt que pourrait avoir une étude serrée au cours d'un traitement pénicillé.

D'autres cas isolés se sont présentés pour lesquels nous avons pu mesurer soit la sensibilité du germe, soit le taux de concentration sanguine, et comparer un de ces deux facteurs à l'évolution clinique.

Notamment un colibacille isolé d'une méningite entrée à l'hôpital dans le coma et décédée trois jours après, malgré un traitement intense par injections intrarachidiennes de 60.000 U.O. par jour en 2 injections, montra un taux d'inhibition de 500 U.O. qui rendait impossible tout essai thérapeutique.

Sensibilités de diverses souches de staphylocoques

Nous avons aussi vérifié *la sensibilité de plusieurs staphylocoques dorés* que nous avons isolés au cours d'affections diverses. Les taux d'inhibition et les index de sensibilité ont été faits le même jour par la méthode des dilutions variées (le staphylocoque standard Londres a été inhibé par un taux de 0,03 U.O.).

1. *Abcès de la cuisse.* — Staphylocoque doré. Inhibé par 0,015 U.O. Index de sensibilité : 0,5.

Guérison rapide sans pénicilline.

2. *Staphylococcie cutanée.* — Staphylocoque doré. Inhibé par 0,12 U.O. Index de sensibilité : 4.

Echec d'un premier traitement pénicillé de 120.000 U.O. par jour pendant cinq jours.

3. *Cystite et uréthrite* à staphylocoques, survenues chez un ancien blennorrhagique, chez lequel les gonocoques ne purent jamais être remis en évidence ni dans le pus urethral, ni dans le liquide prostatique, ni dans le liquide séminal.

Staphylocoque doré. Inhibé par 0,25 U.O. Index de sensibilité : 8.

L'écoulement traité par 3.000.000 d'unités Oxford à raison de 400.000 U.O. par jour, diminua mais ne s'arrêta

pas ; à la sortie, il y a présence constante de staphylocoques.

4. *Anthrax de la nuque.* — Staphylocoque doré. Inhibé par 0,06 U.O. Index de sensibilité : 2.
Guérison.

5. *Staphylococcie cutanée récidivante.* — Staphylocoque doré. Inhibé par 0,30 U.O. Index de sensibilité : 10.

6. *Furonculose récidivante.* — Staphylocoque doré. Inhibé par 0,06 U.O. Index de sensibilité : 2.

Guérison après quatre jours de traitement par 200.000 U.O. intramusculaires.

On constate donc la variabilité des sensibilités de ces six souches : une seule étant plus sensible que le staphylocoque Londres, deux ayant une sensibilité voisine, trois enfin ayant des taux d'inhibition élevés.

Cette étude est relativement facile à entreprendre, le germe étant aisément isolé pur ; elle est susceptible de donner une indication importante pour le traitement.

D'autre part l'évolution clinique montre un parallélisme troublant avec cette sensibilité. Le taux de concentration aurait apporté un élément intéressant, mais il faut noter que la peau a souvent un taux beaucoup plus élevé que le sérum, ce qui explique la guérison des malades par traitement général même faible.

Concentrations sanguines dans les urethrites blennorrhagiques

A l'opposé, nous avons pu étudier *quinze cas de blennorrhagie,* non plus par la sensibilité du germe que nous n'avons pu atteindre, mais par l'étude des concentrations sanguines obtenues chez ces malades.

	taux obtenus U.O.		
	1/4 h.	1 h.	2 h.
I. — S... Uréthrite aiguë récente traitée par 200.000 U.O. en vingt-quatre heures. Arrêt de l'écoulement en deux heures. Guérison vérifiée.....	1	0,50	0,10
II. — B... Uréthrite aiguë récente traitée par 600.000 U.O. en quarante-huit heures. Arrêt de l'écoulement en six heures. Guérison vérifiée	0,70	0,40	0,10
III. — L... Uréthrite aiguë récente traitée par 400.000 U.O. en trente-six heures. Arrêt de l'écoulement en cinq heures. Guérison	0,70	0,40	0,15
IV. — A... Uréthrite aiguë récente traitée par 400.000 U.O. en trente-six heures dont une partie avec de la P. V.P. Guérison	0,30	0,12	0,05
V. — R... Uréthrite aiguë récente traitée par 400.000 U.O. en trente-six heures. Présence de formes géantes après traitement. Sulfamides, pyrétothérapie, lavages, guérison	0,40	0,20	0,10
VI. — L... Uréthrite aiguë récente traitée par 300.000 U.O. en trente-six heures. Persistance de l'écoulement. 200.000 U.O. supplémentaires. Guérison.	0,50	0,15	0,05
VII. — G... Uréthrite aiguë récente traitée par 300.000 U.O. en trente-six heures. Persistance de l'écoulement avec gonocoques. Deuxième traitement. Guérison	0,20	0,05	»

VIII. — Ch... Rechute après un premier traitement de 400.000 U.O. pour uréthrite aiguë. Orchite et écoulement chronique. Deuxième traitement de 500.000 U.O. avec P.V.P. Guérison	0,40	0,03	»
IX. — A... Rechute après un premier traitement de 400.000 U.O. pour urétrite aiguë. Deuxième traitement de 500.000 U.O. Guérison	0,75	0,30	0,10
X. — D..... Blennorrhagie chronique, sulfamido résistante, traitée par 500.000 U.O. Persistance d'un écoulement sans gonocoques	0,45	0,20	0,05
XI. — M..... Blennorrhagie chronique, sulfamido résistante, traitée par 500.000 U.O. Persistance d'un écoulement sans gonocoques	0,36	0,20	0,03
XII. — G... prostatite consécutive à une uréthrite traitée par 500.000 U.O., non guérie. Injections intraprostatiques. Guérison	0,20	0,10	0,05
XIII. — T... Prostatite, *idem*	0,30	0,10	0,00
XIV. — P... Prostatite, *idem*	1,20	0,40	0,05
XV. — B... Prostatite consécutive à une uréthrite non guérie par plusieurs traitements de 500.000 U.O. Injections locales intraprostatiques de 20.000 U.O. Malade non guéri	0,10	»	»

Vouloir prétendre que le pronostic d'une uréthrite blennorrhagique dépend de la manière dont le malade élimine sa Pénicilline, indépendamment de tout facteur germe ou

des nombreux repaires anatomiques susceptibles de se créer, serait évidemment une erreur. La blennorrhagie est avant tout une maladie locale dans laquelle justement le facteur anatomique joue un très grand rôle. La preuve en est donnée par la différence des succès avec la pénicillothérapie entre la maladie de l'homme et de la femme.

Chaque fois que ce facteur anatomique est en jeu, le succès par une thérapeutique générale seule est bien précaire et les quatre cas de prostatite que nous avons donnés ont nécessité un traitement par injections locales de 10.000 ou 20.000 U.O. de Pénicilline intraprostatique. Ce n'est qu'après plusieurs semaines de traitement que le résultat a pu être atteint.

Le facteur de sensibilité du germe joue aussi certainement son rôle, bien que peu d'auteurs aient actuellement signalé des souches de gonocoques vraiment résistantes. Les circonstances nous ont empêché d'entreprendre cette étude d'une manière suivie. Cependant, l'inconstance des résultats actuels par rapport à ceux d'il y a quelques années permet de soupçonner leur existence ; les conditions de terrain étant restées les mêmes, on est obligé d'expliquer la croissance des échecs par une modification du germe.

Cependant, si l'on compare seulement les concentrations sanguines de Pénicilline et les résultats cliniques obtenus, on est frappé de certains parallélismes.

1° Dans le groupe des sept malades traités pour urétrite aiguë récente, les trois malades dont l'écoulement s'est arrêté le plus rapidement, 2-5-6 heures avaient d'une part un clocher de concentration maximum important qui quinze minutes après l'injection atteignait 0,70 U.O. ou 1 U.O., d'autre part l'élimination a certainement duré trois heures, les taux à la deuxième heure, 0,10-0,15 U.O., étant encore élevés.

Un malade qui éliminait aussi en trois heures, mais avait eu un clocher peu élevé à 0,40 U.O., présentait en-

core des formes géantes à la fin du traitement. Il fut guéri par un traitement complémentaire sulfamidé. On pourrait se demander si en plus de la durée d'élimination, le taux maxima obtenu n'aurait pas une importance.

Enfin, les deux malades qui éliminaient en deux heures nécessitèrent une prolongation de traitement qui amena la guérison.

2° Dans le groupe des uréthrites passées à la chronicité, trois sur quatre des malades peuvent être classés comme ayant des concentrations faibles. En effet, après un quart d'heure, les taux furent de 0,36-0,40-0,45, beaucoup moins élevés que la moyenne des taux du groupe précédent. L'élimination fut aussi plus rapide. Le malade chez qui une orchite éclata quarante-huit heures après l'arrêt du premier traitement, n'avait que 0,03 U.O. une heure après l'injection, et rien par la suite. Les deux autres uréthrites chroniques qui avaient résisté à plusieurs traitements sulfamidés répétés, et qui guérirent difficilement, n'avaient que 0,05 et 0,03 au bout de deux heures.

Par contre, le quatrième, qui fit une rechute et ne fut guéri qu'au bout de deux traitements, avait une élimination presque normale.

3° Enfin, dans le groupe des prostatites, les quatre malades étaient tous des uréthritiques, qui avaient été traités à la période aiguë par des sulfamides, et même par la Pénicilline. Ils n'avaient pas guéri et l'uréthrite était passée à la chronicité avec prostatite. Il est certain que cette prostatite à joué son rôle de repaire anatomique, mais il est curieux de constater que deux d'entre elles avaient un taux de 0,05 U.O. à la deuxième heure et deux autres un taux nul.

Les trois premières guérirent avec un traitement local intraprostatique.

Enfin, la dernière dont la courbe d'élimination est la plus basse que nous ayons trouvée : 0,10 U.O. après un

quart d'heure et rien au bout d'une heure, est le seul malade non guéri, même après un traitement local.

Bien que cette étude aurait mérité d'être plus étendue, les quelques cas cités font ressortir qu'il y a dans l'élimination de la Pénicilline par le malade, un facteur qui n'est pas négligeable en clinique.

En guise de conclusions, nous voudrions donner quelques opinions sur l'avenir de la pénicillothérapie. En effet, ce qu'on a appelé l'inflation des doses d'une part, et qui s'est faite en un temps relativement court, beaucoup plus même que pour les sulfamides et, d'autre part, l'augmentation des cas résistants, a inquiété beaucoup de cliniciens. G. Laurence dans un article récent, propose deux explications. La première est que la Pénicilline étant un médicament nouveau, dont les indications avaient au début, été fixées d'après des expériences de laboratoire, demandait une mise au point indispensable. Les doses actuelles représenteraient l'adaptation à la pathologie réelle. C'est si l'on veut l'explication optimiste. La seconde est la résistance croissante des germes à un agent thérapeutique. Cette résistance est un phénomène actuellement bien connu, réalisable. Elle ne serait constituée que par la modification des complexes enzymatiques du germe qui le mettraient ainsi à l'abri du blocage effectué par l'antibiotique. Citant un article de L. Bazy, G. Laurence termine ainsi : « *Les conclusions qui devraient se dégager de pareilles constatations sont qu'il semblerait, pour l'instant tout au moins, que l'homme et le microbe sont engagés dans une lutte sans fin qui obligerait l'homme à découvrir sans cesse de nouveaux moyens thérapeutiques pour pouvoir rejoindre le microbe protée aux perpétuelles transformations, lutte inégale d'ailleurs, où le microbe serait toujours en avance sur l'homme* ».

L'heure n'est tout de même pas, à propos de la Pénicilline, à des conclusions aussi pessimistes, mais il serait

vain de nier ce danger. Cependant, puisqu'il y a lutte, le laboratoire est-il susceptible d'apporter au clinicien une arme pour enrayer cette dévaluation ? C'est ce que nous avons essayé de montrer dans ce travail. Nous croyons que le danger essentiel réside dans les doses sous-thérapeutiques susceptibles de créer chez le malade, même en cours de traitement, une souche résistante qui le restera par la suite. La connaissance de la sensibilité du germe pour lui appliquer un traitement assez fort, nous semble primordiale. Le contrôle ensuite des concentrations obtenues dans les liquides organiques devrait permettre de voir plus clair et d'agir mieux. En s'appuyant sur ces taux, le clinicien essaiera d'augmenter le rendement de la Pénicilline dans l'organisme et là, la voie ouverte aux véhicules-retard nous semble pleine de promesses. Ainsi aidée, il est à souhaiter que la clinique profitera longtemps des ressources qu'offre ce merveilleux antibiotique qu'est la Pénicilline.

CONCLUSIONS

La pénicillothérapie peut, actuellement, s'appuyer sur deux dosages :

1° *Le dosage de la concentration obtenue au cours du traitement dans les liquides organiques.*

De toutes les méthodes proposées, la méthode de dilution en milieu glucosé en présence d'un indicateur de pH de B. Sureau, O. Schurr et F. Depin est celle qui répond le plus aux besoins de la clinique. Titrées par cette méthode, les concentrations sanguines nous ont montré des variations individuelles considérables susceptibles d'expliquer les insuffisances de l'activité thérapeutique.

2° *Le dosage de la sensibilité du germe pathogène à la Pénicilline.*

Elle peut être, cette sensibilité, soit chiffrée par une méthode de dilution sériée, soit évaluée rapidement par une méthode en agar, comme celle de L. P. Garrod. Cette étude permet d'établir la dose thérapeutique efficace.

Ces deux dosages, appliqués à l'étude de quelques cas cliniques, nous ont permis de contrôler le traitement pénicilliné et, ainsi, d'avoir la possibilité de le rendre plus efficace.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes Condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes Confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu :
Le Doyen,
R. DUPÉRIÉ

Bordeaux, le 28 Mars 1947

VU ET PERMIS D'IMPRIMER,
Le Recteur
A. MARCHAUD

BIBLIOGRAPHIE

Abraham (E.P.), Chain (E.), Fletcher (C.M.), Gardner (A.D.), Heatley (N.G.), Jeunings (M.A.) et Florey (H.W.). — Further observations on Penicillin. (*Lancet*, 16 août 1941, t. II, pp. 177-178.)

Atcheson (D.W.), Edmeades (D.T.). — Excrétion sanguine et urinaire de mélange de Pénicilline, d'huile d'arachide et de cire d'abeilles. (*Science New-York*, 24 août 1945, 102, pp. 199-200.)

Benedict (R.G.), Schmidt (W.A.), Coghill (R.R.), Oleson (A.P.). — Stabilité de la Pénicilline en solution aqueuse.

Berrod (J.). — La Pénicilline, ses indications, ses résultats en thérapeutique. (*Thèse*, 1 vol., 182 p., Paris 1945, *Foulon édit.*).

Bigger (J.W.). — Inactivation of Penicillin by serum. (*The Lancet*, 1944, t. II, p. 400.).

Brisquier (A.). — Le traitement de l'endocardite lente, dite maligne, et son pronostic favorable dû à la Pénicilline. (*Presse Médicale*, 20 oct. 1945, t. 42, pp. 560-562.).

Brodie (J.). — Méthode simple et pratique de dosage de la Pénicilline. (*J. Path. Bact.*, avril 1944, 57, pp. 257-258.).

Bonnet-Maury (P.), Perrault (R.). — Enregistrement photométrique du mode d'action des Sulfamides et de la Pénicilline. (*Nature, London*, 4 juin 1945, t. 155, pp. 701-702.).

Bonnet-Maury (P.). — Etude du titrage de la Pénicilline. Méthode des dilutions. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. 72, 1946, n° 11-12, pp. 366.).

Broch (P.), Kerharo (J.), Netik (J.). — La Pénicilline : dosages. (1 vol. 90 p., *Vigot édit.*, 1945.).

Bustinza-Lachiondo (F.). — Les antibiotiques antimicrobiens et la Pénicilline. (1 vol. 286 p., *O. Zeluck, édit., Paris*, 1946.).

Chain (F.), Duthie (E.S.), Callow (D.). — Action bactéricide et bactériolytique de la Pénicilline sur le Staphylocoque. (*Lancet*, 26 mai 1945, t. 248, pp. 652-657).

Chandler (V.L.), Price (C.W.), Randall (W.A.). — Contrôle et précision des dosages de Pénicilline dans le sérum. (*Science, New-York*, 5 oct. 1945, t. 102, pp. 355-356.).

Cholden. — Technique simplifiée pour le dosage de la Pénicilline sur gélose en plaques. (*J. Bact.*, avril 1944.).

Cobs (R.B.), Barker (A.N.), Robertson (E.A.), Cowan (J.T.). — La gélose en thérapeutique locale par la Pénicilline. (*Lancet*, 9 juin 1945, t. 248, pp. 720-721.).

Cooke (J.V.), Goldring (D.). — La concentration de la Pénicilline dans les divers liquides organiques au cours du traitement par la Pénicilline (*S. Amer. Med. Ass.*, 13 janv. 1945, t. 127, pp. 80-87.).

Cooke (J.V.). — A simple clinical method for the testing of Penicillin in body fluids, and for the testing of Penicillin sensibility to bacteria. (*J.A.M.A.*, 24 février 1945, t. 127, pp. 445-449).

Cowan (S.T.). — Différences de sensibilité à la Pénicilline des souches de Staphylocoque H d'Oxford. (*Journ. Path. Bact.*, janv. 1945, t. 57, pp. 145-148).

Dawson (M.H.), Hobby (G.L.) et Lipman (M.O.). — Penicillin sensitivity of strains of non hemolytic streptococci isolated frow cases of subacute bacterial endocarditis. (*Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1944, t. LVI, pp. 101-103).

Deschwanden (J.V.). — La Pénicillorésistance et le traitement de la blennoragie. (*Schweiz. Med. Wschr,* 23 déc. 1944, t. 74, pp. 1319-1320).

Elohosi (A.J.). — Titrages biologiques de la Pénicilline. (*Thèse Paris,* 1945).

Findland (M.), Meads (M.), Ory (E.M.). — Oral Penicillin. (*J.A.M.A.*, 29 sept. 1945, t. 129, pp. 315-320).

Fleming (A.). — In vitro test of Penicillin potency (*Lancet,* 20 juin 1942, t. I, pp. 732-733).

— Streptococcal meningitis treated with Penicillin : measurement of bacteriostatic power of blood and cerebrospinal fluid. (*Lancet,* 9 oct. 1943, t. II, pp. 434-438).

— Micro-methods of estimating Penicillin in blood serum. (*Lancet,* 1944, t. II, pp. 620-621).

— Penicillin content of blood serum after various doses of Penicillin by various routes. (*Lancet,* 1944, t. II, pp. 621-624).

— Micro-méthodes de dosage de la Pénicilline dans le sérum sanguin et les autres liquides organiques. (*Amer. J. Clin. Path.*, janvier 1945, t. 15, pp. 1-6).

Forster (J.W.) et Woodruf (H.B.). — Quantitative estimating of Penicillin. (*J. Biol. Chem.*, 1943, t. CXLIV, pp. 285-286).

— Improvement in the cup assay for Penicillin. (*J. Biol. Chem.*, 1943, t. CXLVIII, p. 729).

— Microbiological aspects of Penicillin. I Method of assay. (*J. Bact.*, 1943, t. XLIV, pp. 187-202).

Forster (J.W.) et Wilker (B.L.). — Microbiological aspects of. Penicillin. II. Turbidometric studies on Penicillin inhibition. (*J. Bact.*, 1943, t. 46, pp. 377).

Forster (J.W.) et Wilker (B.L.). — Microbiological aspects Penicillin. VI. Procedure for the cup assay Penicillin. (*J. Bact.* 1944, t. XLVII, p. 43).

GARROD (L.P.). — The laboratory control of Penicillin treatment. (*Brit. Med. J.*, 15 avril 1944, t. I, pp. 528-530.

— Action de la Pénicilline sur les bactéries. (*Brit Med. J.*, 27 janv. 1945, pp. 107-110).

GARROD (L.P.) et SUREAU (B.). — Rôle du laboratoire au cours du traitement par la Pénicilline. (*La Semaine des Hôpitaux*, N° 2, 14 janvier 1946, p. 57).

HEATLEY (N.G.). — A method for the assay of Penicillin. (*Biochem. J.*, 1944, t. XXXVIII, pp. 61-65).

HEILMANN (D.M.), HERRELL (W.F.). — Emploi de la modification due à Fleming de la technique de Wright pour le dosage de la Pénicilline dans les liquides organiques. (*Amer. J. Clin. Path.*, janvier 1945).

HOBBY (G.L.), MEYER (K.) et CHAFFÉE (E.). — Activity of Penicillin in vitro. (*Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1944, t. LVI, pp. 184-187)

HUNTER (A.C.). — Standardisation des dosages (*J. Bact.*, 1944, t. 47, p. 439).

HÜRIEZ (C.). — Les bases biologiques de la Mycothérapie. (*Gazette des Hôpitaux*, N° 4, 5 février 1946, p. 69).

KIRBY (W.M.M.). — Stability of Penicillin solutions at room and incubations temperatures. (*J.A.M.A.*, 1er juillet 1944, t. XCIX, p. 628).

KIRBY (W.M.M.) et RANTZ (L.A.). — Les méthodes de mesure des concentrations de Pénicilline dans les liquides organiques. (*J. Bact.*, nov. 1944, t. 48, pp. 603-608).

KNUDSEN (L.F.). — Dosage de la Pénicilline. (*Science*, 12 janv. 1945, t. 101, p. 46).

KOCH (R.A.), HAINES (J.S.), HOLLINGSWORTH (W.Y.). — L'intérêt de la Pénicilline dans traitement et lutte contre la blennorrhagie. (*J.A.M.A.*, 13 oct. 1945, t. 129, p. 491-496).

LASSEUR (P.), DUPAIX-LASSEUR (A.), PÉPIN (J.), LÉVÊQUE M.T.), GIRARD (T.) et AUBERT (J.). — Contribution à l'étude de la Pénicilline. (*Trav. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, 1945, t. XIV).

Laurence (G.). — Position actuelle de la Pénicillo-thérapie. (*Journal des Praticiens*, 20 nov. 1946, p. 261).

Lee, Foley, Epstein et Wallace. — Improvement in the turbidometric assay of Penicillin. (*The J. of. Biol. Chem.*, Févr. 1944, p. 485).

Léger. — Pénicilline huileuse. (*Presse Médicale*, 6 avril 1946, t. 15, p. 210).

Lessiau (J.). — Etude de la précision des méthodes de titrage de la Pénicilline. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. 72, 1946, N°s 9-10, p. 835).

Levaditi (C.). — La Pénicilline et ses applications thérapeutiques. (1 vol., *Masson, édit., Paris*, 1945).

Lévy (J.C.). — Contribution à l'étude de la Pénicilline. (*Thèse de Pharmacie, Nancy*, 1945).

Lichtwitz et Bernal (P.). — Technique du traitement de l'endocardite maligne lente par la Pénicilline. (*Semaine des Hôpitaux*, 7 avril 1946).

Lochead (A.G.) et Timonin (M.). — The effect of glucose ou penicillin potency test. (*Canad. J. Pub. Healt.*, 1943, t. XXXIV, pp. 236-240).

Luria (S.E.). — Un procédé de mesure de la sensibilité et de la résistance des Staphylocoques à la Pénicilline. (*Proc. Soc. Exp. Biol., New-York*, janv. 1946, t. 61, pp. 46-51).

Mac Cormack (R.B.), Jones (H.P.) et Plant (G.). — Biological methods of Penicillin assay. (*J. Bact.*, 1944, t. XLVIII, N° 1, p. 121).

Mac Kee (C.M.) et Hauck (C.L.). — Induce Pénicillin resistance in a pneumococcus type III culture. (*Feder. Roc.*, 1943, t II, p. 100).

Martin (R.) et Sureau (B.). — La Pénicilline et ses applications thérapeutiques. (*Paris Méd.* 10 juin 1944, pp. 115-119).

MARTIN (R.), NITTI (F.), SUREAU (B.), BERROD (J.). — La Pénicilline et ses applications cliniques. (1 vol., *Flammarion édit., Coll. Institut Pasteur, Paris,* 1945).

PARKINS. — Mantien de la concentration sanguine de Pénicilline après injection intramusculaire.

PRÉVOT (A.R.). — Méthode de titrage rapide de la Pénicilline par inhibition du pouvoir réducteur du W. Perfringens sur le Vert-Janus. (*Annales de l'Institut Pasteur,* t. 72, 1946, N° 5-6, p. 471).

PRÉVOT (A.R.), PEYRÉ (M.) et DIGEON (M.). — Modifications de la méthode de titrage rapide de la Pénicilline. Bilan d'écarts individuels. (*Annales de l'Institut Pasteur,* t. 72, 1946, N° 9-10, p. 840).

RAKE (G.) et HAWRE (D.H.). — Méthodes microbiologiques d'identification de la Pénicilline (*J. Bact.,* juillet 1944, t. 48, p. 121).

RAKE (G.) et JONES (H.). — A rapid method for estimation of Penicillin. (*Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.,* nov. 1943, pp. 183-190).

RAKE (G.), MAC KEE (C.M.) et JONES (H.). — A rapid test for the activity of certain antibiotic substances. (*Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.,* 1942, t. LI, pp. 273-274).

RANDALL (W.A.), PRICE (C.N.), WELCH (H.). — Dosage de la Pénicilline dans les liquides de l'organisme. (*Science, New-York,* 6 avril 1945, t. 101, pp. 365-366).

RANTZ (L.A.) et KIRBY (W.M.M.). — Action de la Pénicilline sur le staphylocoque in vitro. (*J. Imun. ol.,* juin 1944, t. 48, pp. 335-343).

— Absorption et excrétion de la Pénicilline à la suite de son absorption continue I.V. et S.C. (*J. Clin. Invest.,* sept. 1944, t. 23, pp. 789-794).

RAMMELKAMP (C.H.) et KEEFER (C.S.). — Absorption, excrétion et distribution de la Pénicilline dans l'organisme. (*J. Clin. Invest.,* mai 1943, t. 22, pp. 425-437).

RAMMELKAMP (C.H.). — A method for determining the concentration of Penicillin in body fluids and exsudats. (*Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1942, t. LI, pp. 95-97).

REID (R.D.) et ANDERSON (D.I.). — Méthode pour déterminer la résistance des bactéries aux sulfamides et à la Pénicilline. (*Science, Lancaster*, t. 103, pp. 437-464).

ROMANSKY (H.J.), RITTMAN (G.E.). — Un moyen pour prolonger l'action de la Pénicilline. (*Science, New-York*, 1er sept. 1944, t. 100, pp. 196-198).

ROSEMBERG (D.H.) et SYLVESTER (J.C.). — Excrétien de la Pénicilline dans le L.C.R. de Méningitiques. (*Science, New-York*, 11 août 1944, t. 100, pp. 132-133).

ROSENBLATT (P.), ALTURE-WERBER (E.), KOSCHDAN (F.) et LOEW (L.). — Méthode de détermination du taux de Pénicilline des liquides de l'organisme. (*J. Bact.*, nov. 1944, t. 48, pp. 599-601).

SCHMIDS et MOYER. — Pénicilline. Méthodes de dosage. (*J. Bact.*, févr. 1944, t. 47, pp. 199-210).

SCHMIDT (L.H.) et SESSLER (C.L.). — Developpement of resistance to Penicillin by pneumococci. (*Pro Soc. Eper. Biol. and Med.*, avril 1943, t. LII, pp. 353-357).

SHERWOOD (M.P.), FALCO (E.A.) et DE BEER (E.J.). — A rapid quantitative method for the determination of Penicillin. (*Science*, 24 mars 1944, pp. 247-248).

SLOAN (R.A.), BAKER (R.D.) et FRASER (B.W.). — Dépistage préliminaire au laboratoire des blennorrhagies sulfamido-résistantes. (*Amer. J .Clin. Path.*, janvier 1945, t. 15, pp. 24-27).

SPENCER (J.), BISHOP (E.J.) et RICKS (A.). — Gelée sans corps gras pouvant servir d'excipient à la Pénicilline. (*Lancet*, 26 janv. 1946, t. 250, pp. 127-128).

SUREAU (B.), DEPIN (F.) et SCHURR (O.). — Titrage biologique de la Pénicilline dans le sang et le liquide céphalo-rachidien en présence d'un indicateur de P.H. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1946, N° 7-8, t. 72, p. 665).

TILLETT (W.S.). — Analyse de l'action thérapeutique de la Pénicilline basée sur la réaction des malades et les recherches corrélatives de laboratoires. (*J. Bact.*, mai 1944, t. 47, p. 430).

TODD (E.W.)., TURNER (G.S.) et DREW (L.G.W.). — The temporary character of fastness of Staphylococci to penicillin. (*B.M.J.*, 27 janvier 1943, pp. 111-113).

VELU (H.), PENAU (H.) et BENOIT (D.). — Action du P.H. sur l'activité bactériostatique de la Pénicilline. (*Bull. Acad. Méd. Paris*, 21 février 1946, t. 130, pp. 141-142).

VINCENT (J.G.) et VINCENT (H.W.). Filter paper disc modifications of the Oxford cup Penicillin déterminations. (*Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1944, t. LV, pp. 162-164).

WILE (U.). - L'expérience américaine de Pénicillo-thérapie des maladies vénériennes. (*Journal des Praticiens*, 20 avril 1946, p. 81).

WILSON (U.). — Nouvelle méthode de dosage rapide de la Pénicilline. (*Nature, Londres*, 23 oct. 1943).

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS. 9
INTRODUCTION 11

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES DE DOSAGES 13
Méthodes de diffusion en Agar..... 13
Application au dosage d'une Pénicilline inconnue.. 13
Application au titrage de la sensibilité d'un germe 23
Méthodes de dilutions sériées en milieu liquide 26
Dosage Oxford. Titrage d'une Pénicilline inconnue 26
Méthodes néphélométriques 28
Titrage de la pénicillo-sensibilité d'un germe 30
Micro-méthodes de dilution 34
Méthodes hémolytiques 36
Méthode par inhibition du pouvoir réducteur de W. Perfringens sur le Vert-Janus de A.-R. Prévot 41

CHAPITRE II

TITRAGE BIOLOGIQUE DE LA PENICILLINE DANS LE SANG ET LE LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN PAR LA METHODE DE B. SUREAU, F. DEPIN ET O. SCHURR 45
Principe. 46
Technique 47
Différents facteurs influant sur le titrage 53
Etude de la précision 59

CHAPITRE III

La methode glucose-P.S.P. dans le titrage des echantillons et dilutions utilises en therapeutique. 61

CHAPITRE IV

Etude de la Penicilline suivant diverses voies par la methode de B. Sureau 67

Voie intramusculaire 68

Procédés utilisés pour retarder l'élimination de la Pénicilline après les injections intramusculaires 84

Perfusion intraveineuse 91

Injections dans les cavités closes 92

Injections intra-utérines 94

Aérosols. 95

CHAPITRE V

Etude des concentrations dans divers liquides organiques. 97

CHAPITRE VI

Applications cliniques. Facteurs influant sur le resultat therapeutique 101

Conclusions 119

Bibliographie. 121